
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LA TOXINE STREPTOCOCCIQUE,

PAR LE D^r ALEXANDRE MARMOREK.

Malgré les perfectionnements apportés à la technique bactériologique, il a été jusqu'ici très difficile d'obtenir en dehors de l'organisme une sécrétion de toxine tant soit peu considérable chez la plupart des microbes qui se généralisent chez l'homme ou l'animal. En ce qui concerne le streptocoque, on a parfois réussi en utilisant des bactéries très virulentes; mais il s'agissait d'une exception, et la répétition de l'expérience échoue souvent pour le même microbe pathogène. Deux obstacles s'opposent chez les microbes dits « infectieux » à la production de toxine *in vitro* : la composition des milieux et les propriétés essentielles du microbe. La tâche devait donc être double : il fallait découvrir un milieu spécial et parvenir à stimuler les sécrétions du microbe.

Depuis longtemps, nous essayons d'atteindre ce double but avec le streptocoque. La découverte d'une méthode sûre de préparation de la toxine de ce microbe « infectieux » entre tous pourrait rendre de multiples services : non seulement le principe de la méthode pourrait s'étendre à d'autres microorganismes pathogènes, mais de plus la préparation d'un sérum antitoxique renforcerait singulièrement la vertu curative du sérum préparé par l'injection des corps microbiens.

L'arrêt que subit la multiplication du streptocoque dans son propre filtrat — phénomène que nous avons annoncé à la Société de Biologie¹ il y a plus de cinq ans — montrait une des causes de la pauvreté en toxine des cultures de notre microbe. Car dès qu'il cesse de se multiplier, et cela a lieu une demi-journée après l'ensemencement, il est évident qu'il suspend son

1. Séance du 26 novembre 1896.

activité et reste dans une vie latente, pendant laquelle sont arrêtées ses fonctions essentielles. Dès le début de ces recherches, nous sommes parvenu à remédier à cette particularité en ajoutant de l'extrait de bouillon à la culture, dans le but de déterminer de nouveau une multiplication des microbes.

Cette manœuvre, répétée à plusieurs reprises, finit par donner une quantité de toxine déjà assez considérable. Ce procédé, tout rudimentaire qu'il fût, nous montra la voie dans laquelle nos recherches devaient s'engager. Si d'un côté le microbe ne pousse plus quelques heures après l'ensemencement du milieu, et si d'autre part l'addition de substances nutritives suffit à refaire une culture en pleine activité, il est évident que nous devons chercher un milieu offrant en abondance ces mêmes substances, que l'activité du microbe épuise si rapidement. Nous nous sommes adressé dans ce but à toutes celles qui constituent un des termes de dégradation des matières albuminoïdes; et, après de longues expériences, nous nous sommes arrêté à la composition du milieu suivant, qui présentait tous les caractères voulus. C'est l'addition, au bouillon de viande peptonisé, d'une certaine quantité de leucine et de glycocolle. Nous ajoutons donc à 150 grammes de bouillon 0 gr. 40 de leucine. On chauffe à 60° et l'on fait passer à travers une bougie de porcelaine. On prépare ensuite la solution de glycocolle (0 gr. 50 dans 100 grammes de bouillon), on chauffe et on filtre. On ajoute de chacune de ces deux solutions 10 grammes à 250 grammes de bouillon peptonisé. Le streptocoque pousse parfaitement dans un tel milieu qui, d'ailleurs, reste trouble pendant de longues journées. Mais en outre le streptocoque, ensemencé dans le filtrat d'une telle culture, âgée de trois ou quatre jours, se multiplie très bien. Le liquide semble donc avoir les qualités nécessaires pour fournir une provision continue de toxine. En effet, la toxine ainsi obtenue est d'une activité constante.

Quant à l'autre question, celle de l'augmentation des facultés toxiques du microbe, elle restait à résoudre. L'idée qui nous guida dans nos recherches était l'observation suivante : le microbe paraît provoquer surtout des effets toxiques lorsque la résistance du malade est assez grande pour empêcher la généralisation immédiate du streptocoque. Au contraire, dans le cas d'une septicémie streptococcique, il ne faut pas oublier

que chaque unité de notre microbe doit produire infiniment moins de toxine, puisqu'il faut un nombre si considérable d'individus microbiens pour amener la mort.

De même que la conservation de la virulence du streptocoque exige un milieu spécial (bouillon-ascite), de même, pour transformer notre streptocoque en un microbe capable de donner une abondante provision de toxine, il faut apporter des modifications dans le milieu nutritif. Ce n'est plus le sérum d'un organisme sensible à l'infection streptococcique (homme, lapin) qui devra nous servir, mais au contraire celui d'un organisme très résistant, par exemple le cobaye, dont l'état réfractaire aura été encore renforcé par des injections de sérum antistreptococcique. Mais ce qui nous semble surtout avoir une influence considérable dans l'accroissement du pouvoir toxigène du microbe, c'est l'introduction d'autres agents dans le milieu nutritif. Ces agents sont des leucocytes polynucléaires retirés de l'organisme du cobaye immunisé. Voici donc notre procédé : on injecte à un cobaye déjà immunisé par deux ou trois fortes doses de sérum antistreptococcique, 10 c. c. de bouillon dans la cavité péritonéale. Le lendemain, on saigne l'animal afin d'obtenir son sérum, et on pratique le lavage du péritoine à l'aide d'eau physiologique. Les leucocytes qui s'y sont accumulés à la suite de l'injection de bouillon, une fois retirés avec les précautions aseptiques, sont immédiatement mélangés au sérum d'un autre cobaye, conservés à la température de 37° (sérum trois parties, eau une partie). Nous ne faisons pas subir de passage à travers l'animal au streptocoque destiné à la production de toxine, mais à partir de ce milieu spécial nous l'ensemencions en grande quantité dans un nouveau tube du même milieu, fraîchement préparé. Ce streptocoque sert à l'ensemencement du bouillon additionné de leucine et de glycocolle. On filtre cette culture après huit jours.

De nos recherches il résulte ceci : tous les streptocoques d'origine différente donnent la même toxine ; celle-ci fait partie du groupe de ces diastases qui sont détruites à la température de 70°. Le sérum préparé à l'aide de la toxine du même microbe (notre ancien streptocoque virulent) est actif contre les toxines de streptocoque d'autre origine. Enfin, nous ajouterons que ce procédé nous permet d'obtenir une toxine qui tue un lapin à la dose de 0,25 à 0 c. c. 50.

L'UNITÉ DES STREPTOCOQUES PATHOGÈNES POUR L'HOMME,

PAR LE D^r ALEXANDRE MARMOREK.

Le grand rôle que joue le streptocoque en pathologie et les grandes différences que présentent quelques-uns de ses caractères morphologiques, ont attiré de bonne heure l'attention des bactériologistes; on s'est demandé notamment si toutes les formes en chaînettes rencontrées dans des maladies si diverses, soit à l'état isolé, soit associées à d'autres microbes, appartenaient à une seule et même espèce. Déjà, dans notre travail sur le streptocoque (*Ces Annales*, juillet 1895), parlant de la question des sous-espèces, nous avons refusé toute importance et toute valeur décisive aux caractères extérieurs du microbe, tels que grosseur des grains formant la chaînette, pouvoir de troubler le bouillon de culture, longueur des chapelets. Comme nous avons pu le démontrer dans ce mémoire, il suffit de déterminer une légère modification dans la composition du milieu (sérum-bouillon) pour voir s'effacer toutes ces distinctions, ou pour en faire naître d'autres. Il est vrai que le développement des colonies sous forme de petits points transparents sur milieu gélosé ne varie que dans des limites très étroites, il en est de même d'un autre caractère constant : la forme absolument ronde et régulière des grains. Celle-ci demeure invariable quel que soit le mode d'expérimentation ou quelle que soit la provenance du microbe. Puisque ces deux qualités sont communes à tous les streptocoques, elles deviennent insuffisantes pour établir entre eux de nouveaux groupements systématiques.

Il semblait à beaucoup d'auteurs qu'on eût trouvé dans le sérum antistreptococcique le moyen de dissiper tous les doutes. On pensait que le sérum obtenu par l'injection d'une espèce très virulente devait être en état de combattre l'infection causée par n'importe quel streptocoque, ceci dans l'hypothèse que tous les microbes en chaînettes formaient une seule et même famille; par contre, l'inefficacité du sérum vis-à-vis d'autres formes streptococciques eût été la preuve de l'existence de plusieurs variétés. Très peu d'observateurs comprirent ce qu'avait d'inexact une telle conclusion. *A priori* il était très vraisem-

MASSON & C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de médecine, 120, boulevard Saint-Germain, Paris (VI^e)

Pr. n° 275.

Collection de Planches Murales

destinées à

l'Enseignement

de la Bactériologie

publiée par

l'Institut Pasteur de Paris

L'importance toujours plus grande de la Bactériologie dans les études médicales nous a paru justifier la publication que nous annonçons aujourd'hui.

Il y a tout avantage à pouvoir montrer au cours d'une leçon à un public nombreux, les microbes ou les lésions microscopiques caractéristiques à propos de chaque maladie étudiée. L'utilité de planches murales pour l'enseignement est de toute évidence et nous n'avons pas besoin d'insister.

A ce point de vue, il n'existe dans aucun pays une collection de ce genre, et nous avons voulu combler cette lacune en nous adressant à la source même, à l'Institut Pasteur de Paris, où depuis longtemps déjà, dans le laboratoire du docteur Roux, se fait l'enseignement bactériologique.

Nous avons trouvé là les éléments de notre publication, et nos planches sont la reproduction très exacte de préparations tout à fait typiques et démonstratives, qui servent au cours de microbiologie technique.

Par la lithographie nous avons tenu à reproduire les préparations microscopiques avec leurs couleurs, et les deux figures ci-contre peuvent montrer que la sincérité du dessin ne nuit en rien à l'exécution artistique. Enfin, pour certaines microphotographies qui s'y prêtaient mieux, nous avons préféré employer un procédé absolument rigoureux, la photocollographie.

Cette collection comprend 65 planches, constituant le fondement d'un enseignement bactériologique ou anatomo-pathologique et touche comme principaux sujets : charbon, rouget, choléra des poules, pneumonie, suppuration, peste, choléra, fièvre typhoïde; morve, tuberculose, lèpre, actinomycose, diphtérie, tétanos, etc., et les maladies à protozoaires : coccidies, paludisme, maladie de la bouche tsé-tsé, trypanosomès, etc., etc.

LISTE DES PLANCHES

- | | |
|--|---|
| 1. Bactériacées. | 36. Tuberculose. Tubercule périvasculaire (Rein) 25 ^e jour. |
| 2. — | 37. — Bacilles ramifiés. Dégénérescence jaune. |
| 3. Moisissures. | 38. — Bacilles enkystés. Rate de la Gerbille. |
| 4. Charbon. Colonie sur gélatine. | 39. — Crachat. |
| 5. — Formation des spores. | 40. Lèpre. Coupe de peau. |
| 6. — Sang. | 41. Morve. Pus et coupe de poulmon. |
| 7. — Pulpe de rate. | 42. Actinomycose. Réaction phagocytaire. |
| 8. — Epiploon. | 43. Diphthérie. Culture sur sérum coagulé (Photogr.). |
| 9. — Foie. | 44. — Frottis de fausse membrane. |
| 10. — Rein. | 45. — Coupe de trachée. |
| 11. Choléra des poules. Sang. | 46. Vibron septique. Cils (Photogr.). |
| 12. Rouget. Sang de pigeon. | 47. — — Exsudat péritonéal (Photogr.). |
| 13. — Foie de pigeon. | 48. Charbon symptomatique. Exsudat péritonéal (Photogr.). |
| 14. — Rate du porc. | 49. Tétanos. Bacille avec cils (Photogr.). |
| 15. Staphylocoque. Culture en bouillon (Photogr.). | 50. — Culture avec spores (Photogr.). |
| 16. Streptocoque. Culture en bouillon (Photogr.). | 51. — Spores phagocytées. |
| 17. — Rein. | 52. Cancer. Évolution de l'archoplasma. |
| 18. Pneumocoque. Culture sur gelose (Photogr.). | 53. — Spermatogenèse du cobaye. |
| 19. — Sang. | 54. — Pseudo-coccidies. |
| 20. — Capsules positives et négatives. | 55. Vaccin. Cornée du lapin. |
| 21. Peste. Photogr. de pestiférés (Photogr.). | 56. — Pustule vaccinale, peau du singe. |
| 22. — Culture (Photogr.). | 57. Coccidie du lapin. Cycle évolutif (Schéma). |
| 23. — Sang de rate. | 58. — — Adénome du foie. |
| 24. — Frottis de hubon. | 59. Paludisme. Hématozoaire dans le sang frais. |
| 25. — Epiploon du lapin. | 60. — Hématozoaire dans le sang après coloration. |
| 26. — Foie. | 61. — Évolution de l' <i>Hæmamoeba relicta</i> chez le moustique. |
| 27. Bacille typhique. Cils (Photogr.). | 62. — Anopheles et culex. |
| 28. — — Rate. | 63. Trypanosome du rat. Stades de division. |
| 29. Choléra. Vibrions cholériques. Cils (Photogr.). | 64. — — Agglutination. |
| 30. Fièvre récurrente. Sang. | 65. Trypanosome de la tsé-tsé. Stades de division. |
| 31. Gonocoque. Pus. | |
| 32. Tuberculose. Réaction de l'épiploon. | |
| 33. — Aviaire, rate de lapin, cellules géantes. | |
| 34. — Phagocytose initiale intravasculaire. | |
| 35. — Tubercule intravasculaire, 12 ^e jour. | |

CONDITIONS DE LA PUBLICATION

La collection comprend actuellement 65 planches du format 80×62 centimètres, tirées sur papier toile très fort et munies d'œilletons permettant de les suspendre sur deux pitons. La collection entière est réunie dans un carton disposé spécialement à cet effet.

Elle est accompagnée d'un texte explicatif rédigé en trois langues (français, allemand, anglais).

Prix de la collection : 250 francs (Port en sus)

(Les planches ne sont pas vendues séparément)

La collection sera mise en vente le 15 avril.

Elle sera facturée au prix de souscription (220 francs, port en sus) aux personnes qui auront fait parvenir leur commande avant le 1^{er} juin.

blable qu'un streptocoque exposé à vivre en symbiose avec d'autres bactéries, comme le bacille de Koch ou l'agent pathogène de la scarlatine, fût assez influencé par les nouveaux échanges chimiques pour y gagner d'autres propriétés.

Mais il y a des caractères communs à tous les membres d'une espèce bactérienne : ce sont ceux qui relèvent des fonctions primordiales de la vie, parmi lesquelles la fabrication de la toxine est au premier rang. Avant qu'on eût utilisé la toxine streptococcique pour l'immunisation des chevaux, il était impossible de se servir du sérum comme réactif des différents streptocoques. Depuis 1896, époque à laquelle M. Méry¹ recherchait l'influence du sérum antistreptococcique sur les streptocoques isolés de malades atteints de scarlatine, nous avons essayé d'accumuler le plus grand nombre de faits expérimentaux pour résoudre cette question si importante et si discutée. Nous n'attachons aucune importance à plusieurs signes assez vagues, tels que l'efficacité plus ou moins grande d'un sérum antibactérien sur l'animal infecté par un streptocoque donné, car la valeur de ce sérum dépend beaucoup de la manière et de la durée d'immunisation.

Dans cet ordre d'idées nous n'admettons que des propriétés bio-chimiques, communes à tous les streptocoques, quelle que soit leur origine.

Parmi ces qualités caractéristiques sans exception pour tous les échantillons de streptocoques pathogènes pour l'homme, trois surtout attirèrent notre attention. Nous avons examiné quarante-deux échantillons de provenance diverse. Dès maintenant nous pouvons dire que ces qualités dont nous parlions tout à l'heure, ajoutées aux autres demeurées constantes, nous permettent de définir la parenté entre un streptocoque isolé et tous les autres microbes en chaînettes formant la seule espèce de streptocoques pathogènes pour l'homme, et d'autre part nous autorisent à repousser comme non justifié tout nouveau groupement ou toute division entre ces microbes.

Deux caractères, que nous étudions déjà depuis plusieurs années, doivent être placés en première ligne : ce sont l'hémolyse du sang de lapins *in vivo*, et l'incapacité du streptocoque de pousser dans le filtrat de sa culture.

1. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, séance du 18 avril.

Dès le début de nos recherches sur l'exaltation de la virulence du streptocoque, nous avons constaté que le sang des lapins nous servant à faire nos passages se dissout dans l'organisme même et prend une couleur transparente et limpide de vin de Bourgogne. Cette propriété de dissoudre les globules rouges dans les vaisseaux même est non seulement une attribution du streptocoque, mais, — et cela augmente singulièrement la valeur de ce signe distinctif, — elle croît proportionnellement avec la virulence. Plus un streptocoque est virulent, plus vite et mieux il dissout le sang dans le corps de l'hôte. L'hémolyse *in vitro* peut présenter des différences légères toutefois suivant l'origine du microbe.

Nous avons eu à notre disposition et examiné des streptocoques de l'érysipèle, de la fièvre puerpérale, de l'angine scarlatineuse, de la pneumonie rubéolique, des pustules varioliques, du phlegmon, de la diphtérie, de la tuberculose, de l'influenza — et enfin, comme streptocoques de provenance équine, ceux de l'anasarque et de la gourme.

Dans le but d'exalter la virulence de nos microbes nous avons employé l'ancienne et classique méthode : passage par l'organisme du lapin avec ensemencement intermédiaire dans notre milieu de choix (bouillon-ascite), ou bien encore introduction de sacs de collodion dans la cavité péritonéale de lapins. Pour constater l'hémolyse en dehors de l'organisme, il suffit simplement d'ajouter au milieu de culture (bouillon peptonisé) un peu de sang défibriné, d'ensemencer avec le streptocoque et de porter à l'étuve. Au fur et à mesure que celui-ci se développe et secrète l'hémolysine, le dépôt de sang qui se trouve au fond, se dissout pour ainsi dire et change son opacité et sa couleur rouge foncé en une teinte transparente et rouge de vin. Si nous voulons comparer en même temps la différence du pouvoir hémolytique de deux ou plusieurs streptocoques, il est préférable d'ensemencer avec ceux-ci un tube ou une boîte de Petri, remplis de gélose, faiblement recouverte de sang défibriné. Après un séjour suffisant à l'étuve, il se forme autour de chaque colonie une élégante auréole d'hémoglobine dissoute dont les diamètres différents représentent la mesure du pouvoir dissolvant de chaque streptocoque.

Toutes ces méthodes donnèrent toujours le même résultat.

Tous les streptocoques d'origine humaine se comportèrent d'après les règles sus-mentionnées suivant leur virulence respective. Aussi bien l'agent de l'anasarque ne se distingue point par une différence marquée de tous les streptocoques humains. Un seul streptocoque avait toujours sa place à part. C'est celui qu'on retire de l'angine scarlatineuse. Evidemment il dissout (aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*) les hématies, mais son pouvoir hémolytique s'est montré toutefois de beaucoup inférieur à celui des autres microbes comparés. Même en augmentant sa virulence expérimentalement, l'hémolyse ainsi produite n'atteignit pas un degré très élevé, restant néanmoins évidente.

Donc, ce streptocoque partage avec les autres la qualité de sécréter de l'hémolysine; on peut dire qu'il n'offre que des différences quantitatives et non qualitatives. Quant au microbe de la gourme, son pouvoir hémolytique atteint ordinairement celui du streptocoque qu'on trouve dans la scarlatine.

Qu'il nous soit permis, en passant, de constater que les perfectionnements apportés à la préparation du sérum antistreptococcique ont donné des résultats thérapeutiques meilleurs dans les complications à streptocoques de la scarlatine; mais, par contre, on ne saurait encore constater l'influence du même sérum sur la gourme comme cela a été prouvé depuis longtemps pour l'anasarque (Nocard-Lignières).

Quant au second signe, commun à tous les streptocoques, dont nous parlerons immédiatement, les deux streptocoques (celui de la scarlatine et celui de la gourme) tiennent une place à part, mais toujours de telle sorte que le streptocoque isolé de la scarlatine ressemble, malgré une petite différence, aux autres formes en chaînettes d'origine humaine, tandis que celui de la gourme ne participe guère à cette qualité commune.

Nous avons parlé de cette propriété dans une note communiquée à la Société de Biologie¹.

Nous y avons dit :

« Peu d'heures après l'ensemencement dans les milieux même les plus appropriés à sa vie, ce microbe cesse complètement de se multiplier; à partir de ce moment, les chaînettes commencent à tomber au fond et le liquide devient parfaitement

1. Façon dont se comporte le streptocoque dans le liquide de culture où il a déjà poussé. Séance du 26 novembre 1896.

clair. Si l'on filtre la culture et si, dans le liquide filtré, on ensemence une nouvelle trace de streptocoques, aucune multiplication n'aura lieu. Notons, cependant, que les microbes ensemencés y restent encore vivants 15 jours et plus. Si l'on veut qu'ils puissent se développer dans un semblable milieu, il est indispensable d'y ajouter une très petite quantité de milieu neuf (du bouillon ordinaire, par exemple, ou un peu d'extrait de bouillon). Pareillement, si l'on ajoute un faible volume de milieu neuf à une culture où tout développement s'est arrêté, on voit au bout de quelques heures le développement reprendre et le liquide se troubler à nouveau. »

Et nous continuions : « Le même fait a été constaté par nous pour d'autres microbes, tels que le pneumocoque, le microbe du choléra des poules... Le milieu dans lequel a vécu le streptocoque, et qui est devenu impropre à sa culture, permet cependant le développement des autres espèces microbiennes, telles que le staphylocoque, le pneumocoque, etc. *Il y a donc là une réaction spécifique du milieu de culture filtré vis-à-vis du streptocoque.* »

Nous nous servons dans ces expériences du dispositif suivant : On met dans un tube à essai 8 à 10 c. c. du filtrat streptococcique (des cultures de 24 à 48 heures sont déjà très convenables pour cette expérience) et on y ensemence une trace d'une culture riche. On agite et on met le tube à l'étuve à 37°. Or, malgré un séjour prolongé, on n'y constate aucun développement de streptocoques. Le filtrat reste limpide. Tous les streptocoques éprouvés par nous, excepté ceux de la scarlatine et de la gourme, se comportent d'une façon égale. Ils ne poussent ni dans leur propre filtrat ni dans celui d'un autre streptocoque. Des deux streptocoques ayant des propriétés particulières, celui de la scarlatine ne se développe que faiblement, l'autre toujours plus fortement. Nous pouvons donc nous représenter toute une gamme, depuis le filtrat laissé clair par les autres streptocoques, en passant par le trouble léger du streptocoque scarlatineux jusqu'au trouble plus louche du microbe de la gourme et finissant enfin par la culture la plus riche de toutes, celle d'un streptocoque poussant sur milieu ordinaire. Cette méthode ne nous a permis de relever aucune différence entre les divers streptocoques d'origine scarlatineuse que nous avons eus à notre disposition. De même, quelle que soit la provenance de la culture

streptococcique filtrée, l'ensemencement d'un échantillon de streptocoque scarlatineux nous a toujours présenté une culture aussi peu développée sur un filtrat que sur un autre.

Toutefois, il existe une gradation entre le trouble que donne le streptocoque de la scarlatine ensemencé sur un filtrat streptococcique et un pneumocoque développé dans un filtrat analogue. Ce dernier produit une opacité et une multiplication beaucoup plus riches.

A remarquer que le streptocoque de la gourme se rapproche presque, dans ces conditions, d'un microbe étranger se développant dans un tel filtrat.

Nous considérons comme troisième réaction bio-chimique l'action sur tous les streptocoques du sérum antitoxique retiré à des chevaux que nous immunisons depuis des années avec une toxine streptococcique, produite toujours par le même échantillon (notre ancien streptocoque virulent¹).

Nous avons expérimenté avec ce sérum antitoxique l'immunisation de lapins contre tous les streptocoques. Les résultats étaient fort réguliers. Nous constatons bien des différences dans la quantité à employer, mais nous réussissions toujours, avec de fortes doses, à prévenir la mort des animaux, même de ceux qui avaient reçu le streptocoque de la scarlatine. Les différences de sensibilité vis-à-vis du sérum qui s'y rencontrent (et que M. Méry a déjà signalées dans ses essais avec le sérum antibactérien) permettent peut-être de supposer que les streptocoques sont plus ou moins longtemps associés à l'agent pathogène de la scarlatine, et par conséquent inégalement impressionnés au cours de la symbiose.

Par contre, les essais faits avec le streptocoque de la gourme ne donnèrent pas de résultats concluants.

A tous ces caractères que revêt le streptocoque, il faut en ajouter un dernier, mais auquel nous n'attribuons qu'une valeur réduite : la faculté d'exalter à notre gré la virulence du streptocoque par une des méthodes mentionnées.

1. Nous avons divisé, dès le commencement de 1896, nos chevaux destinés à la préparation du sérum antistreptococcique en deux groupes. Les uns reçoivent les corps microbiens de streptocoques de toute provenance que nous pouvons nous procurer (et par conséquent des quarante-deux échantillons), tandis que l'autre série ne reçoit régulièrement que de la toxine. On délivre toujours un mélange du sérum des deux groupes de chevaux.

Cette qualité est commune à tous les streptocoques de n'importe quelle origine, — en admettant toutefois que cette exaltation dans la virulence soit plus marquée et plus rapide chez quelques-uns que chez d'autres.

Il reste une qualité que nous n'avons pas encore eu le temps de bien étudier, mais que nous réservons pour un travail ultérieur : la possibilité d'une démonstration éventuelle de la sensibilisatrice par la méthode Bordet-Gengou, et l'étude de cette substance au point de vue des différences qu'elle peut présenter chez les divers streptocoques.

Mais de longues recherches déjà entreprises nous ont prouvé que tous les streptocoques d'origine humaine, dans leurs fonctions bio-chimiques que nous venons de décrire, se comportent de la même façon. Même « la variété » qui semble si éloignée, le streptocoque de la scarlatine, présente seulement une divergence quantitative, mais ressemble essentiellement aux autres. Le streptocoque de la gourme se distingue trop, dans certaines propriétés fondamentales, des streptocoques d'origine humaine pour pouvoir se classer avec ceux-ci.

Nous croyons être autorisé à déclarer que, jusqu'à ce jour, aucune preuve scientifique n'a été apportée de l'hypothèse d'une diversité de races des streptocoques de l'homme. Au contraire, tout porte à croire que les cocci en chaînettes qu'on rencontre si souvent chez l'homme, appartiennent à une même famille. Si les streptocoques vivent longtemps associés à d'autres microbes pathogènes, on comprend aisément que cela leur imprime des signes extérieurs, qui de leur côté ne sont pas capables d'influencer leur composition intrinsèque, leurs fonctions physiologiques. Celles-ci restent les mêmes, tant que nous avons pu les étudier, et pour ces raisons nous persistons encore à admettre l'unité des streptocoques pathogènes pour l'homme.

SUR LE BLEUISSEMENT DE CERTAINS CHAMPIGNONS

DU GENRE « BOLETUS »

PAR M. GABRIEL BERTRAND.

Quand on casse ou qu'on froisse certains champignons appartenant au genre *Boletus*, on voit la chair mise à nu ou la partie lésée prendre rapidement une coloration d'un beau bleu. Cette coloration est très fugace et disparaît après quelques minutes. En France, on désigne communément ces champignons sous le nom de faux cèpes ou de faux bolets et, sans doute à cause de leur changement de couleur, on les considère comme vénéneux.

Plusieurs savants ont cherché, mais sans y parvenir d'une manière définitive, à donner l'explication de ce curieux phénomène.

Schönbein, en particulier, dans une lettre écrite à Faraday et publiée dans la *Philosophical Magazine*, en 1856¹, a indiqué qu'on peut extraire de *Boletus luridus* Schaeff un principe résineux incolore, facilement soluble dans l'alcool et présentant avec la résine de gayac la plus étroite analogie : tous les réactifs qui bleussent la solution alcoolique de résine de gayac agissent, en effet, de la même manière, sur la solution alcoolique de *Boletus luridus*. Comme, d'autre part, cette dernière solution se conserve à l'air sans se colorer, il faut bien admettre, toujours d'après Schönbein, qu'il y a dans le champignon une substance particulière capable de transformer l'oxygène de l'air en ozone. En fait, le jus de divers champignons colore en bleu la solution alcoolique de *Boletus luridus*.

J'ai montré par une série d'expériences publiées en collaboration avec M. Bourquelot² que les faits intéressants observés par Schönbein sont exacts ; bien plus, que la laccase, extraite par moi de l'arbre à laque, existe aussi dans beaucoup de champignons et que c'est notamment à son intervention qu'il faut rapporter le bleuissement des bolets.

Après ces observations, il semblait qu'il n'y eût plus, pour connaître à fond le phénomène, qu'à savoir quel est le corps sur

1. Tome XI, 4^e série, p. 137.

2. *Comptes rendus Soc. de Biologie*, 40^e année, t. II, p. 379 et p. 582 (1895).

lequel se porte l'action de la laccase. On va voir dans la suite de ce travail que le bleuissement des bolets est en réalité un phénomène beaucoup plus complexe).

Quand on fait macérer dans l'alcool des fragments d'un bolet bleuisant quelconque, *Boletus cyanescens* Bull., *B. luridus* Schæff., *B. Satanas* Lenz, *B. pachypus* Fr., *B. Lupinus* Fr., etc., soit à froid, soit mieux encore à la température de l'ébullition, on obtient un liquide jaune. Celui-ci renferme le chromogène, puisqu'il bleuit à l'air par addition de laccase, mais on n'est pas certain que les substances organiques ou minérales qu'il contient en même temps ne jouent pas aussi un rôle dans l'apparition de la couleur bleue. Il fallait donc séparer le corps chromogène. Or l'expérience, plusieurs fois tentée, n'avait pas encore réussi.

Phipson, qui s'est occupé aussi du bleuissement des bolets, a bien prétendu que ces champignons renfermaient un principe incolore, analogue et peut-être même identique à l'aniline¹, mais Ludwig, et, avec lui, Gonnermann² ont prouvé que cette assertion était erronée. Pour eux, le chromogène des bolets bleuisants est un corps spécial, de nature azotée. Ils n'ont pas pu l'obtenir à l'état pur, mais ils ont reconnu qu'il ne présente ni les réactions de l'aniline ni, comme le croyait Rabenhorst³, celle d'un composé de l'acide cyanhydrique.

Après une série d'essais, que la pénurie de champignons pendant plusieurs années a rendu fort longue, j'ai été assez heureux pour extraire enfin le chromogène des bolets bleuisants sous la forme cristallisée.

Je dirai tout de suite que ce chromogène, auquel je donne le nom de bolétol, est, non pas incolore, mais d'un rouge orange vif, comme l'alizarine. En solution concentrée, il présente la même couleur, mais si l'on dilue beaucoup, la solution devient peu à peu jaune d'or, puis jaune pur. C'est sous cette dernière couleur que le bolétol apparaît toujours dans les bolets qui en contiennent.

Aussi est-il curieux que les divers auteurs ayant étudié les bolets bleuisants aient prétendu que la chair de ces champignons était d'abord blanche.

1. *Comptes rendus Ac. d. Sc.* LI., p. 107 (1860) et *Journ. Soc. sc. méd. Brux.* 1860, et *Chemical News*, t. XXV, p. 304 (1872).

2. *Archiv. der Pharmacie*, 2^e série, t. CXLIX, p. 107-117, 1872.

3. Cité par Ludwig.

Quand on casse un de ces champignons et qu'on observe le changement de couleur immédiatement, on voit, avec la plus grande netteté, le tissu passer du jaune au vert avant de devenir bleu. Un peu plus tard, la couleur bleue disparaît et, seulement alors, le tissu devient blanc ou grisâtre.

Le bolétol n'existe chez les champignons qu'en très petite quantité : 5 à 10 grammes au plus par 100 kilogrammes; encore, cette petite quantité diminue-t-elle assez vite après la cueillette. Pour préparer le bolétol, je m'arrangeai donc de manière à revenir de mes excursions au laboratoire avant la fin de la journée. Les champignons étaient alors coupés en petits morceaux et ceux-ci jetés au fur et à mesure dans de l'alcool bouillant. Après un quart d'heure de chauffage, les réactions diastasiques étant arrêtées, je pouvais éteindre le feu et remettre la suite des opérations au lendemain.

La préparation du bolétol est un peu délicate. Elle repose sur quelques propriétés physiques assez particulières et voici comment on peut l'exécuter.

Les champignons, aussi frais que possible, sont divisés et mis à bouillir avec de l'alcool, comme il a été dit plus haut¹. On prend 5 parties d'alcool à 95 0/0 pour 1 de champignons. L'ébullition est maintenue une demi-heure pour détruire les oxydases et dissoudre complètement le bolétol. Sans refroidir, on passe à travers une toile métallique fine; on presse les morceaux de champignons et les liquides réunis sont précipités par l'acétate neutre de plomb. Après refroidissement, on complète la précipitation par quelques centimètres cubes d'acétate basique. Le précipité plombique jaune est recueilli, lavé, puis délayé dans une petite quantité d'eau froide, renfermant 10 0/0 d'acide chlorhydrique. Une partie du bolétol passe en dissolution avec d'autres corps organiques. Après filtration à la trompe, on peut l'extraire du liquide par agitation avec de l'éther. Dans les conditions où nous sommes placés, le bolétol est très soluble dans l'éther; mais comme l'eau le retient énergiquement, il faut faire

1. Le bolétol n'existe pas seulement chez les bolets énumérés plus haut. On en trouve aussi chez d'autres espèces, par exemple : *Boletus subtomentosus* L., *B. chrysenteron* Bull., etc., dont la chair, d'un jaune pâle, peut être exposée à l'air sans devenir bleue. Ces champignons, très pauvres ou exempts de laccase, sont presque aussi bons pour l'extraction du bolétol.

Le latex de *Lactarius deliciosus* L. se comporte à l'air comme le suc des bolets bleuissants, mais je n'ai pu en traiter une quantité suffisante pour m'assurer qu'il renferme vraiment du bolétol.

plusieurs extractions. Chaque fois, l'éther décanté est filtré, puis distillé. Il reste un sirop rouge sang, qu'on abandonne dans une capsule à l'évaporation complète.

Le résidu, repris par l'eau froide, cède généralement à celle-ci tout son bolétole, tandis qu'il reste une certaine quantité de cristaux peu colorés et difficilement solubles, qu'on sépare par le filtre. La solution aqueuse de bolétole est de nouveau concentrée dans le vide à consistance de sirop. Quelquefois, en quelques jours, le bolétole cristallise. Sinon, on ajoute un peu d'acide chlorhydrique et, en 24 heures, le sirop se transforme en une bouillie grenue. On essore et on recristallise dans l'eau, par évaporation à sec. Quelques impuretés se séparent dans les zones extérieures qu'on met à part; on recueille la portion centrale, d'une couleur rouge vif, et on la purifie par de nouvelles cristallisations.

Cette méthode ne donne qu'une partie du bolétole. Pour obtenir le reste, il faut traiter le précipité plombique par l'éther. On dissout ainsi une assez forte proportion de matières grasses, qui renaient le corps cherché en dissolution. Quand l'éther a été chassé par distillation, on épuise le résidu gras par l'eau chaude: le bolétole se dissout alors, dans un grand état de pureté. On filtre après refroidissement sur un filtre mouillé: on concentre dans le vide la solution aqueuse et on en retire le bolétole par agitation avec de l'éther.

Le produit obtenu dans cette dernière partie de la préparation est de beaucoup le plus facile à obtenir pur, à cause de l'action dissolvante, presque spécifique, des matières grasses. Aussi doit-on chercher à retenir, du moins momentanément, la plus grande quantité possible de bolétole à l'état de dissolution dans la graisse de champignons. On emploie donc assez d'alcool pour que le titre final du liquide d'extraction reste suffisamment élevé, et on traite ce liquide par le plomb quand il est encore chaud: le précipité entraîne alors la quantité maximale de matières grasses.

Le bolétole cristallise en fines aiguilles. A cet état, il est peu soluble dans l'eau froide, relativement peu soluble aussi dans l'éther et même l'alcool froids. Si on chauffe à l'ébullition, il se dissout au contraire en grande quantité dans tous ces liquides;

1. G. BERTRAND, Sur quelques propriétés de la dioxyacétone en relation avec l'état d'agrégation moléculaire, *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXIX, p. 344, 1899.

mais, comme la dioxyacétone¹, il reste entièrement dissous lorsqu'on refroidit; il faut évaporer de nouveau à sec pour qu'il recrystallise. Cette particularité laisse supposer que le bolétole existe aussi sous deux états d'agrégation moléculaire différents, dont le plus simple est seul très soluble. Les impuretés qui accompagnent le bolétole, et qui sont relativement abondantes quand les champignons sont traités trop tard après la récolte, retardent beaucoup l'agrégation des particules qui conduit à la forme cristalline. C'est à combattre leur effet que l'addition — empirique — d'un peu d'acide chlorhydrique au sirop de bolétole brut est destinée.

Le bolétole ne se dissout ni dans le chloroforme ni dans l'éther de pétrole, la benzine ou le sulfure de carbone. En solution dans l'eau, il absorbe les radiations lumineuses les plus réfrangibles, jusqu'à celles qui correspondent au vert; mais il ne donne pas de bande d'absorption dans le reste du spectre.

Je ne m'étendrai dans ce mémoire ni sur la composition ni sur les propriétés chimiques du bolétole; j'ai obtenu trop peu de matière cette année pour avoir la certitude nécessaire à cet égard. Pour le moment, il nous suffit d'ailleurs de savoir que ce corps, qui n'est pas azoté, présente tous les caractères d'un acide-phénol¹.

Ce qui frappe, tout d'abord, quand on traite une solution de bolétole dans l'eau distillée par la laccase, extraite de l'arbre à laque ou de divers champignons, c'est l'irrégularité et même la difficulté avec laquelle on obtient une coloration bleue. Mais bientôt, en variant les expériences et en notant les résultats avec soin, voici ce qu'on observe :

Quand on se sert d'une solution de laccase peu active, préparée par macération dans la glycérine, d'espèces médiocres de champignons, ou, ce qui est la même chose, d'une solution glycinée un peu ancienne, on est obligé d'ajouter une quantité notable de solution de laccase. Alors, la coloration du bolétole devient toujours d'un beau bleu.

Si au contraire, on emploie une solution de laccase très active, tirée de l'arbre à laque ou, récemment, d'une bonne

1. Ce qu'on pouvait en partie prévoir d'après les relations qui existent entre la constitution des corps organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase (G. BERTRAND, *Bull. Soc. chim.* 3^e série, t. XV, p. 791, 1896.)

espèce de Russule, il suffit d'une trace de liquide fermentaire pour faire virer la couleur du bolétol, mais alors la teinte obtenue n'est jamais d'un bleu franc : elle est verte, quelquefois même gris sale ou rougeâtre.

On est ainsi conduit à supposer qu'une substance particulière, accompagnant le bolétol (expériences anciennes) et la laccase (expériences nouvelles), intervient aussi dans la production du phénomène et, tout naturellement, il vient à l'esprit que cette substance pourrait bien être le manganèse.

L'expérience prouve que la première partie de la déduction est exacte, mais que la substance nouvelle est non pas du manganèse, mais un métal à peu près quelconque, alcalino-terreux, magnésien ou même alcalin.

Il suit de là que pour obtenir à coup sûr une belle coloration bleue, il faut prendre une solution aqueuse d'un bolétate, celui de potassium, par exemple. On peut encore arriver au même but, avec le bolétol pur, en ajoutant au mélange en réaction une trace de l'un des sels appartenant aux métaux énumérés cidessus.

A cause de la petite quantité de bolétol qui est nécessaire, la réaction est extrêmement sensible; elle décèle très bien les moindres souillures des vases de verre dans lesquels on l'exécute ou la présence des sels dans l'eau qu'on emploie.

La production de diverses couleurs trouve son explication dans ce fait que le composé quinonique dérivé du bolétol est lui-même de couleur rougeâtre, tandis que ses combinaisons métalliques sont bleues. En acidifiant le liquide bleu, on met en liberté la bolétoquinone et la couleur vire immédiatement au rougeâtre.

D'après ces observations et mes recherches antérieures¹, le bleuissement des bolets exige donc le concours de six facteurs différents : l'oxygène et le bolétol ; la laccase, le manganèse, l'eau, qui agit à la fois comme dissolvant et comme agent nécessaire d'hydrolyse ; enfin, un métal alcalin, magnésien ou alcalino-terreux.

C'est un exemple remarquable de la complication que peuvent quelquefois présenter les réactions diastasiques et, d'une manière plus générale, les phénomènes biochimiques.

1. Sur le pouvoir oxydant des sels manganoux et sur la constitution chimique de la laccase (*Bull. Soc. chim.*, 3^e série, t. XVII, p. 753, 1897).

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PALUDISME ET DE SON HÉMATOZOAIRE EN ALGÉRIE (CONSTANTINE)

PAR LE D^r A. BILLET

(Médecin-major de 1^{re} classe, docteur ès sciences naturelles.)

(NOTE PRÉLIMINAIRE)

Les recherches que nous poursuivons depuis plus de deux ans, à Constantine, concernant le paludisme et son hématozoaire, nous conduisent, dès aujourd'hui, d'après un total de 395 observations¹, à formuler les principales règles fondamentales du développement de ce parasite, suivant les différentes formes de l'infection palustre qu'il détermine.

Il existe, en Algérie, ainsi que l'ont observé presque tous les médecins depuis la conquête, deux saisons météorologiques bien distinctes pendant lesquelles le paludisme affecte des allures différentes, en même temps que le parasite, lui aussi, présente deux séries de formes bien tranchées :

1^o *La saison estivo-automnale*, que M. Laveran, le premier, a nettement délimitée et qui s'étend de la fin du mois de juin à la fin du mois de novembre. Cette saison s'annonce, au mois de

1. Chacune de ces observations, recueillies dans notre service de l'hôpital militaire de Constantine, comprend non seulement l'examen clinique de chaque malade avec tous les renseignements relatifs à l'étiologie, au mode fébrile et à la nature des principaux symptômes notés dans le cours de l'affection, mais encore un feuillet hématologique où, à côté du nombre et de la forme des parasites rencontrés, on a dressé la formule hémoleucocytaire correspondante.

Dans une note récente (*Soc. de Biologie*, 7 déc. 1901), après avoir établi la présence constante de l'hématozoaire dans tous les cas de paludisme que nous avons eu à traiter, nous avons énuméré les différentes formes sous lesquelles nous l'avons rencontré, soit :

1 ^o Formes amiboïdes grandes, pigmentées, aboutissant au mode de multiplication endogène par <i>rosaces</i> ..	193 fois.
2 ^o Formes amiboïdes, petites, peu ou pas pigmentées, seules.....	44 —
3 ^o Formes amiboïdes petites et <i>croissants</i>	152 —
4 ^o <i>Croissants</i> seuls.....	6 —
Total.....	395 fois.

juin, par de violents orages, suivis de fortes chaleurs; le vent du sud ou *siroco* domine; et bientôt survient une sécheresse presque ininterrompue pendant les mois de juillet, août et septembre. La température maxima moyenne oscille alors entre 30° et 35°. En octobre, puis en novembre, des pluies abondantes, souvent même torrentielles, apparaissent, qui abaissent peu à peu la moyenne de la température à 8° ou 10°.

Pendant cette période, à côté des rechutes graves chez d'anciens impaludés, on voit éclore les premières atteintes de paludisme chez les individus nouvellement arrivés dans la colonie et qui ont passé l'hiver et le printemps sans être contaminés.

Le médecin militaire est mieux placé que tout autre pour étudier ce fait d'observation générale sur le contingent venu de France afin d'accomplir ses trois années de service, et qu'il peut suivre journellement, pour ainsi dire, en notant chez le même sujet l'époque exacte de la première atteinte, la fréquence et la nature des rechutes subséquentes, et finalement leur disparition définitive ou temporaire par le traitement spécifique.

On est ainsi amené à poser comme axiome fondamental l'aphorisme suivant :

On ne contracte pas le paludisme en Algérie, sur le littoral du moins, avant les derniers jours du mois de juin, et cela même dans les localités les plus notoirement insalubres¹.

Le paludisme qui atteint, pour la première fois, les nouveaux arrivés en Algérie est très souvent irrégulier (au sens le plus large du mot) et dans ses manifestations cliniques et dans les modalités de son type fébrile.

Au lieu de présenter, comme dans les accès francs, la succession des trois stades connus de frissons, de chaleur, de sueurs, il affecte fréquemment des formes frustes et anormales. Un des termes du syndrome classique précédent, quelquefois même plusieurs à la fois, peuvent manquer et les symptômes d'infection profonde, à allures parfois manifestement typhoïdes, dominent la scène.

1. La fin du mois de juin est également la date que presque tous les auteurs s'accordent à assigner à l'apparition du paludisme de première invasion dans le bassin méditerranéen, et en particulier dans les trois péninsules : ibérique, italique et hellénique. Nous avons montré (*Acad. des Sciences*, 2 sept. 1901) qu'en Algérie cette date coïncidait précisément avec l'éclosion et l'apparition, dans les régions palustres, de certaines espèces de culicides, en particulier du genre *Anopheles* dont le rôle actif dans la propagation du paludisme a été surabondamment démontré partout où règne l'endémie palustre.

Il en résulte que ce paludisme, dit de première invasion, aboutit fréquemment, et pour ainsi dire d'emblée, soit à la cachexie palustre, soit à la perniciosité avec ses formes infiniment variées.

Nous désignons cette première manifestation du paludisme sous le terme de *paludisme primaire* pour indiquer que c'est le *premier échelon* de l'infection palustre aiguë, et pour l'opposer au second échelon de cette même infection, ou *paludisme secondaire*, que nous décrirons plus loin.

Le terme de paludisme primaire a en outre le mérite de ne rien préjuger des manifestations cliniques à la fois si variées et si inconstantes qu'on y observe et dont la nomenclature n'a pas peu contribué à obscurcir la conception que l'on doit se faire actuellement du paludisme. Il sert au contraire à réunir ces multiples désignations en un seul faisceau compact, car elles relèvent toutes d'une seule et même cause pathogénique.

Si, en effet, le paludisme primaire est éminemment capricieux dans son évolution clinique, le parasite qui le détermine est au contraire, dans la majorité des cas, toujours identique à lui-même.

Il se présente constamment, pendant toute la durée de la période fébrile, aussi bien dans le cours des premiers accès que dans le cours des nombreuses rechutes de la saison estivo-automnale, sous une forme invariable. Cette forme du parasite est la forme endoglobulaire petite, ne dépassant guère 1 à 3 μ de diamètre, arrondie-ovale, peu ou pas amiboïde, constituée par une zone extérieure et annulaire de *cytoplasma* excessivement mince, ne présentant que rarement quelques grains isolés de *mélanine*, et entourant un noyau vacuolaire, central, relativement volumineux, muni lui-même d'un grain de chromatine excentrique ou *karyosome*.

Ce parasite correspond exactement à la forme la plus petite de l'hématozoaire décrit par M. Laveran (*Hamamaba malariae*, var. *parva*, Laveran.)

C'est le parasite de la fièvre estivo-automnale des auteurs italiens, identique lui-même au parasite de la fièvre tropicale des auteurs allemands et anglais (*Hamamaba* ou *Plasmodium præcox*, Grassi et Feletti, *Hæmomenas præcox*, Ross).

Dans la majorité des cas, cette petite forme, surtout dans les

rechutes du mois de septembre et octobre, aboutit invariablement à la forme dite en *croissant*.

Or, il est prouvé aujourd'hui que les *croissants* sont analogues aux *macrogamètes* et *microgamètes* du cycle évolutif d'autres *Sporozoaires*. Ils représentent un des stades de la reproduction *sexuée* du parasite, dont l'évolution ultérieure et complète (*sporogonie*) s'achève dans le corps de certains diptères suceurs de la famille des *Culicidés*.

Nous avons rencontré ces deux formes caractéristiques dans 202 cas de paludisme primaire. Elles se répartissent de la façon suivante :

Formes amiboïdes petites seules.....	44 fois.
— — — et croissants consécutifs...	152 —
— en croissant seules	6 —
Total	<u>202 fois.</u>

Au point de vue de la répartition mensuelle, on trouve :

	Juillet	Août.	Septembre.	Octobre.	Novembre et décembre.	TOTAL
Formes amiboïdes petites seules ..	4	5	23	11	4	44
— — — et croissants consécutifs.....	6	21	41	63	21	152
Croissants seuls.....	"	"	"	1	5	6
Total général.....						202

Autrement dit, c'est surtout en septembre que les formes amiboïdes petites se rencontrent seules, et en octobre que leur association avec les croissants est la plus fréquente.

En général, c'est pendant la période fébrile que l'on trouve la petite forme amiboïde, tandis que les croissants n'apparaissent qu'au bout de quelques jours d'apyrexie et persistent pendant toute la durée de celle-ci jusque dans les derniers jours de la saison estivo-automnale, et cela malgré le traitement quinqué qui semble n'avoir aucune action sur eux.

Au point de vue de l'abondance des parasites, c'est pendant

les mois d'août et de septembre que les petites formes amiboïdes présentent leur maximum de développement. Il n'est pas rare alors de noter jusqu'à 5, 6, 10 globules parasités, parfois même davantage par champ du microscope. Un certain nombre de globules peuvent même renfermer 2, 3 et 4 parasites à la fois, dérivés l'un de l'autre par simple bipartition.

En octobre, au contraire, les croissants abondent. On peut en compter 2, 3 et quelque fois 5 et 6 par champ du microscope.

Puis, peu à peu, ces derniers deviennent de plus en plus rares, pour diminuer notablement de fréquence dans les derniers jours de novembre et finalement disparaître complètement à la fin de décembre ou au commencement de janvier.

Dès lors, les croissants ne réapparaissent plus dans le cours de l'infection palustre et chez le même individu, quel que soit le nombre des rechutes subséquentes.

Ceci nous amène à formuler cette autre proposition :

Le paludisme primaire ne dure qu'une saison estivo-automnale, du mois de juin au mois de décembre.

Cette loi s'est présentée à notre observation avec une régularité et une constance telles que, inversement, lorsqu'un individu autrefois impaludé, mais qui n'a pas eu de rechute de paludisme depuis plusieurs années, a de nouveaux accès fébriles avec petits corps amiboïdes et corps en croissants, on peut affirmer à coup sûr qu'il y a chez lui *ré-infection*, c'est-à-dire *récidive*.

Nous avons constaté le fait chez 13 sujets algériens et chez 22 indigènes qui n'avaient pas eu depuis longtemps d'attaque de paludisme, et qui se présentaient à notre examen atteints de nouveaux accès intermittents avec les parasites du paludisme primaire ;

2° *La saison hiberno-vernale* s'étend de la fin du mois de novembre ou du commencement de décembre à la fin du mois de juin de l'année suivante. Pendant cette période, la pluie ne tombe plus que par intervalles plus ou moins espacés ; les vents du nord et du nord-ouest sont les vents dominants et amènent, dès le mois de décembre, un froid de plus en plus vif. Puis, peu à peu, le printemps et les belles journées réapparaissent avec une température moyenne de 10° à 12°.

Le paludisme, quoique moins accentué que dans la période

précédente, se manifeste néanmoins pendant la saison hiberno-vernale. Mais, ainsi que nous l'avons déjà dit, on ne signale jamais, pendant cette période, de cas nouveaux de paludisme primaire.

On n'y observe uniquement, et sans aucune exception, que des rechutes de paludisme, et cela aussi bien chez les sujets déjà impaludés depuis plusieurs années que chez les paludéens dont l'infection ne remonte qu'à la saison estivo-automnale précédente.

M. Laveran¹ a, depuis longtemps, insisté sur ce fait d'observation générale, dont l'importance n'échappera à personne.

Nous désignons cette seconde manifestation du paludisme sous le nom de *Paludisme secondaire*, par opposition au paludisme primaire, dont il diffère à la fois par ses caractères cliniques et par la forme du parasite qu'on y trouve.

Nous préférons cette dénomination à celle de « Paludisme de deuxième invasion », qui peut prêter à confusion. Nous réservons d'autre part le terme de *Paludisme chronique* au paludisme invétéré, caractérisé par les altérations profondes de l'organisme et en particulier des organes hématopoiétiques.

Au point de vue clinique, on y observe, pour la première fois, d'une façon constante, les types fébriles nettement définis des accès intermittents : type quotidien, type tierce et type quarte. Les types irréguliers, ainsi que le type sub-continu n'existent que fort rarement. En même temps, les accès se présentent avec la triade symptomatique classique (stades de frissons, de chaleur et de sueurs) qui caractérise les fièvres intermittentes dites *parfaites* par certains auteurs.

Quant au parasite, il est *exclusivement* représenté par les grandes formes amiboïdes endoglobulaires fortement pigmentées de mélanine, dont le type adulte, sphérique, volumineux, envahit tout le globule et atteint son développement complet en 48 heures (dans les accès tierces) ou en 72 heures (dans les accès quartes).

De même que la forme amiboïde petite aboutit presque invariablement au *croissant*, et constitue le premier terme du mode de reproduction sexuée du parasite, la forme amiboïde grande et pigmentée aboutit fatalement à la *rosace*, c'est-à-dire au mode

1. *Traité du Paludisme*, 1893, p. 23.

de multiplication endogène par *schizogonie*. Les nombreux segments, ou *mérozoïtes*, qui en résultent se répandent dans le sérum et envahissent de nouveaux globules renouvelant incessamment la maladie par *auto-infection*, et donnant ainsi le signal d'un nombre indéfini de rechutes.

Ce parasite correspond exactement, suivant la forme des rosaces et la nature tierce ou quarte des accès qu'il détermine, tantôt à la variété *tertiana*, tantôt à la variété *quartana* de l'*Hamamæba malarie* de M. Laveran.

Un grand nombre d'auteurs ont fait de ces deux sortes de formes deux espèces distinctes : *Hamamæba* = *Plasmodium vivax* (parasite de la tierce) Grassi et Feletti, et *Hamamæba* = *Plasmodium malarie* (parasite de la quarte) Grassi et Feletti.

Nous trouvons, parmi nos observations, 53 cas de paludisme secondaire survenus pendant les deux saisons hiverno-vernales de 1900 et de 1901. A ces cas, on doit ajouter les rechutes constatées dans les périodes estivo-automnales de 1899, de 1900 et de 1901, chez d'anciens paludéens, et dont le nombre s'élève à 138. Chez ces derniers en effet, malgré la différence des saisons, on n'observe que les formes amiboïdes, grandes, pigmentées, à multiplication endogène.

Le paludisme secondaire, quelle que soit la saison pendant laquelle il se manifeste, est donc essentiellement caractérisé par la présence des formes parasitaires amiboïdes, grandes et pigmentées, aboutissant au mode de multiplication par voie endogène ou asexuée.

Des considérations précédentes, il résulte que :

1^o Si le paludisme présente des modalités et des manifestations cliniques très diverses, suivant la saison où il se déclare et surtout suivant le degré de réceptivité de l'individu qu'il contamine, il n'en constitue pas moins une entité morbide bien définie caractérisée par des lésions anatomo-pathologiques toujours identiques et un parasite endoglobulaire également unique;

2^o Le parasite parcourt dans son développement un double cycle évolutif :

A. — *Cycle estivo-automnal*, de première invasion ou du paludisme primaire, qui n'évolue que chez les sujets jusqu'alors indemnes d'infection palustre. Ce cycle est représenté par la forme amiboïde petite de l'hématozoaire et aboutit, dans la majorité des cas, au *croissant*, première phase du

mode le plus fréquent de reproduction sexuée de ce parasite ;

B. — *Cycle hiberno-vernal*, ou du paludisme secondaire, c'est-à-dire du paludisme que l'on rencontre chez les sujets ayant précédemment subi une première atteinte.

Ce cycle est représenté par la forme amiboïde grande et pigmentée du même hématozoaire, et aboutit à la *rosace*, stade ultime du mode de multiplication par voie endogène ou asexuée de ce parasite.

Aux nombreuses preuves que nous venons de donner de l'unité dans le mode de développement du parasite et de son double cycle évolutif, il convient d'ajouter que, dans 20 cas différents, nous avons pu assister directement à l'évolution du paludisme primaire en paludisme secondaire, autrement dit au passage des formes petites accompagnées de croissants aux formes amiboïdes grandes et pigmentées.

Ces observations concernent des individus chez lesquels nous avons pu surprendre cette transformation pendant leur séjour à l'hôpital et principalement pendant les premiers mois d'hiver, ou bien des paludéens qui, ayant contracté leur première atteinte (paludisme primaire) pendant une saison estivo-automnale donnée, revenaient se faire soigner, dans le cours de la saison hiberno-vernale suivante, atteints de paludisme secondaire.

Dans ce dernier cas, on ne saurait objecter que ces malades aient subi une nouvelle infection ; puisque nous avons démontré et posé en principe le fait suivant, à savoir qu'on ne contracte

1. Nous disons, à dessein, que le *croissant* représente la première phase du mode le plus fréquent (nous devrions ajouter le plus caractéristique) de la reproduction sexuée de l'hématozoaire du paludisme.

En effet, un certain nombre d'auteurs, entre autres Bignami et Bastianelli, ont décrit, dans le cycle évolutif du parasite de la tierce, d'autres formes sexuées endoglobulaires, représentant des macrogamètes et des microgamètes. Ces formes sexuées sont régulièrement arrondies et d'un tiers plus petites que les formes de segmentation (*Annali di igiene sperim.*, IX, 1899).

Cette distinction morphologique, entre la forme générale des gamètes, les uns de forme arrondie, les autres en forme de croissant, est un des principaux arguments des auteurs précités en faveur de la séparation spécifique du parasite de la tierce proprement dite, et celui de la fièvre estivo-automnale.

Or, tout récemment, J. Ewing (*New-York med. Journ.* July 27, 1901) a observé chez les paludéens revenant de Cuba, et chez lesquels l'infection était intense, la présence de *formes de conjugaison*, entre deux hématozoaires de la tierce, inclus dans un même globule. Il a étudié la fusion de leurs *cytoplasmes* et de leurs *karyosomes*, en un seul corps protoplasmique arrondi, à noyau unique, qui plus tard devenait soit un macrogamète, soit un microgamète. Ces corps sexués ne diffèrent en rien de ceux décrits par Bignami et Bastianelli.

D'après ces observations précises de J. Ewing, il semblerait donc prouvé qu'à côté des formes sexuées d'emblée, qui caractérisent ce que nous avons appelé le paludisme primaire, il existe des formes également sexuées, particulières au paludisme secondaire et produites par conjugaison.

pas le paludisme en Algérie pendant la saison hiberno-vernale. Par conséquent, le paludisme dont ces malades présentaient les manifestations secondaires pendant une saison hiberno-vernale donnée était bien la succession du même paludisme contracté pendant la période estivo-automnale précédente.

Les idées que nous venons d'exposer et qui, nous le répétons, ne sont que l'interprétation exacte des faits que nous avons observés pendant plus de deux années, confirment celles que M. Laveran a constamment défendues, depuis le jour où il a fait la mémorable découverte de l'hématozoaire du paludisme.

Elles corroborent également les recherches précises effectuées au Sénégal par Marchoux, en Italie par Antolisei, et, en partie du moins, à Cuba, par J. Ewing.

Elles concordent enfin avec ce que nous connaissons jusqu'à ce jour de la biologie, non seulement des *hæmocytozoa* ou *hémospories*, mais encore de la plupart des sporozoaires.

Mais si l'étude du paludisme en Algérie ne nous autorise pas à admettre l'autonomie spécifique du parasite, dit de la fièvre estivo-automnale ou tropicale, nous inclinons fortement à penser qu'il existe une distinction fondamentale entre les deux espèces de formes amiboïdes grandes et pigmentées, qui caractérisent d'une part les accès francs de fièvre tierce, et d'autre part ceux de fièvre quarte de notre paludisme secondaire.

Nous ne possédons que 11 observations de fièvre quarte bien confirmée. Mais chaque fois, soit au début, soit pendant le cours des nombreuses rechutes qu'ont présentées les sujets atteints de ce type tenace de fièvre intermittente, nous avons pu nous convaincre des différences essentielles qui existent entre les formes à multiplication endogène de la tierce et les formes correspondantes de la quarte.

Les principales de ces différences, formulées par Golgi dès 1891, sont les suivantes : 1^o formes amiboïdes moins volumineuses dans le parasite de la quarte, à noyau moins visible, en raison de l'abondance du pigment mélanique, dont les grains sont également plus gros et plus noirs, à contours moins irréguliers, et surtout à *rosaces* généralement segmentées en 8 mérozoïtes, au lieu de 16 à 20 dans les rosaces de la tierce, qui sont elles-mêmes beaucoup plus volumineuses ; 2^o déformation et hypertrophie très accentuées des globules parasités dans la

tierce; tandis que dans la quarte, les globules parasités conservent leur forme et leurs dimensions presque intactes, et souvent même sont plutôt rétractés; 3° enfin, apparition dans les globules parasités de l'altération granuleuse particulière de l'hémoglobine, décrite pour la première fois par Schüffner¹, et en second lieu par Maurer², altération très appréciable dans la tierce, tandis qu'elle est nulle ou à peine sensible dans la quarte.

Conclusions. — En définitive, la conception du paludisme telle que nous le comprenons d'après l'ensemble des faits que nous avons observés est la suivante : Il existe, en Algérie, deux formes de paludisme correspondant à deux espèces de parasites bien distinctes : le paludisme de la fièvre tierce et le paludisme de la fièvre quarte, ce dernier étant beaucoup plus rare que le premier (2,7 0/0 à Constantine).

Chacune de ces formes de paludisme présente un double cycle clinique et parasitaire à savoir : 1° cycle estivo-automnal, à manifestations primaires survenant chez les sujets non encore impaludés, à type fébrile souvent mal délimité, et dont le parasite est représenté par la forme amiboïde petite et croissants consécutifs (cycle parasitaire de reproduction sexuée); 2° cycle hiberno-vernal, à manifestations secondaires, chez les sujets déjà impaludés depuis une ou plusieurs années, à type nettement tierce ou nettement quarte, et dont le parasite est représenté par la forme amiboïde grande fortement pigmentée et rosaces consécutives (cycle parasitaire de multiplication endogène ou asexuée³).

1. *Deutsch. Archiv. f. klin. Med.*, t. LXIV. Cette altération toute spéciale, qui, pour nous, est intimement liée à la production de mélanine, ne se décèle que par le mélange d'éosine et de bleu de méthylène, suivant les méthodes de Romanówsky et de M. Laveran, ou autres procédés qui en dérivent.

2. *Centralbl. f. Bakter.*, XXVIII, n°s 4 et 5.

3. Cette conception de paludisme se trouve déjà entièrement démontrée en ce qui concerne le parasite de la tierce. Quant au parasite de la quarte, la vérification semble plus difficile, en raison même de la rareté de cette forme de paludisme en Algérie, sur le littoral du moins. Toutefois, sur les onze cas de fièvre quarte dont nous avons déjà parlé, nous avons pu, à deux reprises différentes, suivre pas à pas la transformation des formes amiboïdes petites, avec leurs croissants, en formes amiboïdes grandes et pigmentées, à multiplication asexuée. Il nous a semblé, en particulier, que les formes amiboïdes petites du paludisme primaire de type quarte étaient plus volumineuses que celles correspondantes du paludisme primaire de la tierce. Enfin et surtout, les croissants nous ont paru manifestement plus gros, plus trapus, à extrémités moins effilées, plus arrondies, et à grains de pigment mélanique plus noirs, plus confluent et plus volumineux que ceux des croissants de la tierce.

RECHERCHES SUR LES MODES D'UTILISATION DES ALIMENTS TERNAIRES

PAR LES VÉGÉTAUX ET PAR LES MICROBES

PAR P. MAZÉ

(Chef de laboratoire de l'Institut Pasteur).

PREMIER MÉMOIRE

Les hydrates de carbone alimentaires soumis à l'action des sucs digestifs se dédoublent peu à peu, par voie d'hydrolyse, pour aboutir aux hexoses, et c'est à cet état qu'ils sont considérés comme directement assimilables.

Si l'on veut puiser dans la littérature quelques renseignements sur les transformations ultérieures que la cellule leur fait subir, on s'aperçoit tout de suite que l'on sait peu de choses sur ce côté de la question. Je me propose d'exposer dans ce travail les recherches que j'ai faites pour tenter de faire un pas dans cette voie.

On admet généralement que chez les animaux supérieurs, les sucres semblent constituer exclusivement une source d'énergie et de chaleur; ce ne sont pas des substances destinées à contribuer à la formation de la matière vivante; c'est un combustible que la cellule brûle, pour développer de la force ou pour entretenir la température.

Si l'on descend l'échelle des êtres vivants et si l'on considère les organismes les plus simples comme les microbes, cette conception ne correspond plus à la réalité des faits. Beaucoup de microbes, et les moisissures plus spécialement, sont capables d'édifier leurs matières protéiques aux dépens du carbone du sucre, avec l'ammoniaque comme source d'azote; mais la cellule adulte semble, du moins en apparence, agir comme la cellule animale vis-à-vis du sucre; tout se passe comme si celui-ci subissait la combustion totale; on ne trouve généralement, comme produits ultimes des transformations dont il est le siège,

que l'acide carbonique et l'eau, lorsque l'alimentation est convenable et qu'il n'y a jamais pénurie d'oxygène.

Les levures et les moisissures sont des agents de combustion très actifs lorsqu'ils se développent à la surface des milieux de culture, en large contact avec l'air; mais en même temps que la fraction la plus importante du sucre se résout en eau et acide carbonique, l'autre portion, qui est loin d'être négligeable, se retrouve à l'état de substances vivantes, qui, pour la plupart, ne présentent plus aucune parenté de constitution avec les sucres et l'ammoniaque qui ont servi à les former. Peut-on déterminer quel est le fragment de la molécule sucrée qui entre définitivement dans la constitution des matières protéiques? Voilà ce qu'il faudrait montrer. Mais auparavant, il s'agit d'orienter les recherches.

Lorsqu'on ménage l'accès de l'air à des cultures de levures ou de moisissures, ou qu'on les en prive complètement, on sait qu'on assiste à des phénomènes différents de ceux que je viens de résumer. Les levures font disparaître rapidement le sucre; on en trouve à peu près la moitié à l'état d'alcool, l'autre s'étant volatilisée à l'état d'acide carbonique; mais par contre, l'augmentation de poids de cellules vivantes est faible, ou nulle, ou négative, suivant les conditions de l'expérience. Les moisissures se comportent à peu près de la même façon; le sucre disparaît à l'état d'alcool et d'acide carbonique, mais très lentement; l'accroissement du poids de mycélium est également très faible ou nul.

Dans le premier cas, celui des cultures aérées, la cellule vivante, qui s'est multipliée dans des proportions énormes, vit comme un végétal ordinaire pris pendant la période germinative; elle a mené une vie végétative; dans le second, elle a agi comme un ferment.

Ces deux existences nous apparaissent comme tout à fait distinctes, et on est d'autant plus fondé à les séparer que les produits de transformation du sucre se présentent comme des substances nuisibles vis-à-vis de la cellule ferment qui les a formés. En l'absence d'oxygène, ses fonctions protoplasmiques ont été complètement déviées ou profondément altérées; la vie végétative est une vie normale, physiologique; l'organisme ferment est un être malade puisqu'il donne naissance, en apparence, à des produits pathologiques.

La découverte de la zymase par M. Buchner se présente comme étant susceptible d'enlever à cette conception un peu de son assurance; mais elle ne suffit pas à l'ébranler complètement, parce que cette diastase ne semble apparaître que lorsque le végétal est privé d'oxygène; la levure végétative n'en renferme pas. Cependant, lorsqu'on place un végétal entier dans une atmosphère débarrassée d'oxygène, on peut constater immédiatement la formation d'alcool dans ses tissus. M. Berthelot¹ insiste, avec raison, sur la nécessité de tuer immédiatement par la vapeur d'eau les feuilles ou les parties de végétaux chez lesquelles on recherche de petites quantités d'alcool, parce que si l'on attend quelques instants, on risque de ne trouver que de l'alcool formé après l'ablation des organes, surtout si on les soumet vivants au broyage; cela veut dire que la zymase, ou une diastase analogue, existe même dans les tissus végétaux exposés au soleil, bien que la fonction chlorophyllienne donne naissance dans la profondeur des tissus à des quantités considérables d'oxygène naissant. On ne peut donc pas affirmer, sans réserves, qu'il n'y a pas de zymase dans la levure végétative parce qu'on n'en trouve pas; il serait peut-être plus prudent de dire qu'on ne peut pas la mettre en évidence parce que les moyens de l'obtenir deviennent tout de suite insuffisants là où il y en a peu.

Cela nous conduit à nous demander si l'alcool apparaît sous l'influence de la levure parce que la privation d'oxygène altère ses fonctions, ou plus simplement parce que cette condition la met dans l'impossibilité de tirer parti d'une transformation qui est dans l'ordre.

C'est cette dernière hypothèse que confirment les recherches que j'ai faites sur les rapports de l'oxygène avec les graines en voie de germination². J'ai montré que les graines oléagineuses submergées conservent à peu près intactes leurs matières grasses pendant des semaines et des mois; mais les réserves amylacées des graines féculentes se dissolvent peu à peu sous l'influence des diastases; ce n'est pas un sucre réducteur qui s'accumule dans l'eau comme on aurait pu s'y attendre, c'est l'alcool; ainsi, l'amylase, la dextrinase, la maltase et la zymase

1. *C. R.*, t. CXXVIII, p. 1366.

2. *Ces Annales*, 1900, p. 350.

fonctionnent aussi bien en l'absence qu'en présence de l'oxygène ; toutes ces diastases ne font pas intervenir l'oxygène dans les changements qu'elles apportent à la constitution des aliments hydrocarbonés. J'ai établi également que si les huiles restent indemnes, c'est parce que l'oxygène fait défaut et j'ai fait remarquer que si les transformations des sucres ne dépassent pas le terme alcool, c'est parce que la cellule vivante ne peut pas modifier ce produit sans faire intervenir l'oxygène. C'est là une déduction par analogie et c'est un point qu'il faut démontrer directement.

J'examinerai donc de plus près les conditions de la production d'alcool par les graines ou les végétaux privés d'oxygène de façon à mieux en pénétrer le mécanisme ; je poursuivrai ensuite l'étude de l'assimilation des aliments ternaires pendant la période germinative en adoptant comme principe de rechercher des faits qui contredisent la conception que je viens d'esquisser ; et si, au contraire, j'en tire une confirmation, j'emprunterai des arguments plus probants aux végétaux microscopiques avec lesquels l'expérience se simplifie, en même temps qu'elle atteint un plus haut degré de précision.

II

Je vais d'abord compléter, par le tableau suivant, les renseignements que j'ai déjà fournis dans le mémoire auquel j'ai fait allusion et dans la note des *Comptes Rendus*¹, sur la production de l'alcool par les graines submergées.

TABLEAU I

1 Nos d'ordre.	2 Nombre de graines sub- mergées.	3 Poids sec en grammes.	4 Volume d'eau distillée en c. c.	5 Durée de l'expérience.	6 Alcool recueilli 1/0 du poids des graines.	7 Perte tota de poids 0/0
<i>Pois.</i>						
1	40	7,007	80	6 jours	2,34	10,58
2	id.	6,081	id.	12 —	4,63	17,33
3	id.	6,614	id.	27 —	6,56	27,26
4	100	15,845	100	4 —	4,63	10,88
5	id.	16,003	id.	13 —	10,54	25,78
<i>Haricot.</i>						
6	20	8,594	50	7 —	1,86	»
<i>Lupin blanc.</i>						
7	20	7,730	100	5 —	0,89	»
	id.	7,093	id.	—	4,53	11,33
	id.	7,006	id.	—	28	47,47

<i>Arachide.</i>						
10	25	40,905	100	10 —	0,64	7,7
11	id.	40,196	id.	29 —	1,61	11,63
12	id.	40,551	id.	59 —	0,60	14,80
<i>Maïs.</i>						
13	50	17,988	100	9 —	0,81	3,83
14	id.	18,032	id.	13 —	1,24	»

Les chiffres de la colonne 6, relatifs aux pois, dénotent une différence assez grande entre les divers lots submergés. Cette variation tient à deux causes : les lots nos 4 et 5 ont été immergés dans un volume d'eau relativement beaucoup plus faible que les 3 précédents. De plus, dans ceux-ci, on n'a évalué que l'alcool diffusé dans le liquide ambiant, tandis que dans les deux autres, on a évalué l'alcool total, celui qui a diffusé dans l'eau et celui qui a été retenu par les graines. Pour toutes les autres espèces, l'alcool produit a été évalué en totalité, dans les graines et dans l'eau ambiante.

Considérés dans leur ensemble, les chiffres de ce tableau montrent que la production d'alcool par les graines submergées est variable d'une famille à l'autre, et dans une même famille d'une espèce à l'autre.

Les pois sont des producteurs très actifs d'alcool; les haricots en donnent moins; le lupin blanc, moins aussi que le haricot; l'arachide, qui appartient comme les précédents à la famille des légumineuses, est la moins active de toutes les graines que j'ai examinées. Cela tient en partie à la nature des réserves : les pois et le haricot sont des graines presque exclusivement amy-lacées si l'on n'envisage que les réserves ternaires; le lupin blanc renferme beaucoup de sucres solubles, des matières grasses et pas d'amidon; l'arachide est très riche en huiles; elle renferme plus de 50 0/0 de son poids en matières grasses; mais à côté, il y a encore un peu d'amidon et des sucres. Plus il y a de matières grasses, moins l'aptitude à produire de l'alcool est marquée. J'ai montré en effet que les matières grasses ne sont pas atteintes dans ces conditions. On les retrouve intactes à peu près, après des semaines et des mois de submersion.

Les graminées représentées par le maïs produisent peu d'alcool, et solubilisent lentement l'amidon, à en juger par la faible perte de poids total accusée par l'expérience 13. On est surpris de ce résultat si l'on pense que le maïs est un végétal à germi-

nation extrêmement rapide, même à la température de 22-23°, à laquelle toutes ces expériences ont été réalisées. En moins de 24 heures quelquefois, la tigellè sort de sa gaine et la radicule également; au bout de 4-5 jours, la tige atteint 1 décimètre de long. Une évolution aussi active témoigne d'une digestion extrêmement énergique des réserves de l'albumen et du scutellum; on devrait en retrouver les effets dans les graines submergées. Si l'on observe le contraire, c'est parce que l'absence de plantule supprime la circulation des diastases sécrétées dans le scutellum qui doivent affluer dans l'albumen pour agir sur l'amidon, et des produits des actions diastasiques, sucres et dextrine, qui ne peuvent rencontrer de zymase ailleurs que dans le scutellum, la seule région vivante des semences de graminées. Ainsi nous voyons apparaître l'influence de la suppression de la plantule sur la marche de la digestion des réserves. C'est une constatation dont nous aurons à tenir compte dans d'autres circonstances.

Depuis la publication de mes premières observations, MM. Godlewsky et Polzeniusz¹ ont étudié de leur côté la question de la production d'alcool par les graines submergées. Ils se sont surtout attachés à démontrer que sa formation est due à une véritable fermentation alcoolique. Pour cela, ils ont opéré, en l'absence d'oxygène, dans un appareil clos, capable de supporter le vide et ils ont recueilli la totalité de l'alcool et de l'acide carbonique produits.

Ils ont ainsi trouvé que ces deux composés sont toujours dans la proportion fournie par une fermentation alcoolique pure. J'aurai l'occasion de confirmer ce résultat que je n'ai visé qu'indirectement.

MM. Godlewsky et Polzeniusz ont examiné aussi diverses espèces de graines au point de vue de leur aptitude à produire de l'alcool, lorsqu'elles sont placées sous l'eau. Dans cet ordre d'idées, ils ont obtenu des chiffres un peu plus élevés que ceux que j'ai fournis; mais le sens de leurs conclusions confirment mes résultats.

Je ne veux donc pas insister plus longtemps sur ce côté de la question qui ne présente, en somme, qu'un accident dans la vie du végétal, si on se borne à le considérer isolément. Il relève en effet de la propriété que possèdent les cellules végétales de

1. *C. R. de l'Académie des sciences de Cracovie*, 1901, p. 227.

produire de l'alcool, lorsqu'on les place dans une atmosphère privée d'oxygène, ainsi que l'ont montré depuis longtemps MM. Lechartier et Bellamy¹, Pasteur², Müntz³.

Ce qu'il importe surtout, c'est de mettre en évidence la signification physiologique du phénomène.

Au lieu d'immerger les graines de pois dans l'eau, on a pris des cotylédons débarrassés de leurs embryons, et on les a placés sur des perles de verre, avec une quantité suffisante d'eau distillée; ils se trouvaient ainsi dans les conditions requises pour provoquer une germination rapide chez des pois entiers.

Voici les résultats fournis par trois expériences. Dans la première, on n'a pris aucune précaution pour retenir l'alcool, les cotylédons étaient placés dans un vase fermé simplement par un tampon coton. Les deux autres ont été réalisées dans un appareil clos, dont on trouvera la description plus loin, p. 211, permettant de recueillir l'alcool et l'acide carbonique.

TABLEAU II

N ^{os} d'ordre.	Poids sec des graines entières en milligr.	Nombre de cotylédons.	Durée de l'expérience.	Alcool recueilli en milligr.	Acide carbo- nique dégagé, en milligr.
1	1945	61	21 jours	98	»
2	1855	23	8 —	150	260,5
3		21	8 —	170	231,8

Dans le n^o 1 il y a eu une perte assez élevée d'alcool; on conçoit qu'il n'en saurait être autrement, si l'on fait remarquer que les cotylédons sont exposés par toute leur surface à l'air atmosphérique.

Dans les n^{os} 2 et 3, on voit qu'il s'est formé plus d'acide carbonique que n'en fournirait, pour les quantités d'alcool trouvé, une véritable fermentation alcoolique.

Le contact libre avec l'oxygène atmosphérique modifie donc la marche de la digestion des réserves; mais avant de conclure que l'alcool se montre ici comme un produit normal, il faut montrer que la plante est capable de l'utiliser; en attendant, on ne saurait se refuser à admettre que les conditions de formation d'alcool dans les cotylédons exposés à l'air sont exactement les mêmes que celles qui favorisent l'évolution de l'embryon; l'absence de plantule ne peut pas être invoquée

1. *C. R.*, 1869, t. LXIX, p. 356, 466; t. LXXV, 1872, p. 4203; t. LXXIX, 1874, p. 946 et 1066.

2. *C. R.*, t. LXXV, 1872, p. 754 et 1054.

3. *C. R.*, t. LXXXVI, p. 49.

pour expliquer l'apparition de l'alcool; il est vrai que la transpiration active la circulation de la sève, mais les cotylédons de pois conservent pendant toute la durée de la germination un volume constant; quand ils ont atteint leur turgescence maximum, ils ne se modifient plus, et les rapports des cotylédons adhérents à la plante avec l'air atmosphérique doivent être les mêmes que chez ceux qui sont débarrassés de leurs embryons. On va voir par les expériences suivantes qu'il en est bien ainsi.

Faisons germer des pois, toujours à l'abri des microbes, et quand les plantules ont atteint quelques centimètres de longueur, recouvrons-les d'eau distillée, de façon à ce que le niveau de l'eau dépasse les plus longues de quelques millimètres.

On remarque tout de suite que le développement s'arrête; à part cela, les plantes ne présentent rien d'anormal pendant 5 ou 6 jours. Puis, brusquement, elles changent d'aspect; les tiges deviennent translucides; le cylindre central se détache sur toute la longueur suivant une ligne opaque; c'est le signe que les cellules ont subi le phénomène de la plasmolyse, que les méats sont remplis d'eau. Les plantes sont mortes. Si on recherche l'alcool, on en trouve des quantités encore plus abondantes que si les cotylédons seuls avaient subi le traitement.

Voici, pour fixer les idées, la quantité d'alcool recueilli dans une expérience exécutée dans ces conditions.

On fait germer 20 pois à l'obscurité, à la température de 22-23° pendant 7 jours. Les tigelles ont environ 3 centimètres de longueur. On les couvre d'eau distillée; au bout de 5 jours, on observe les phénomènes qui caractérisent la mort des plantes et on met fin à l'expérience. On trouve dans le liquide 130 milligrammes d'alcool, ce qui fait à peu près 3,25 0/0 d'alcool du poids initial des graines, et on n'avait pris aucune précaution pour éviter les pertes par évaporation.

Si, au lieu de recouvrir d'eau toutes les plantules, on a soin de s'arrêter à un niveau tel qu'une petite partie seulement du bourgeon terminal de deux ou trois tiges émerge du liquide, celles-ci continuent de pousser sans manifester le moindre trouble. Leurs voisines meurent après avoir produit de l'alcool qui s'est diffusé dans l'eau.

Quelle est l'interprétation qu'on peut donner de ce résultat? Si l'on admet que la partie laissée à l'air a permis à l'oxygène

de circuler librement, en quantité suffisante, jusque dans la profondeur des cotylédons et l'extrémité des racines pour prévenir la formation d'alcool, on ne saurait s'étonner de les voir pousser; mais même en admettant qu'il en soit ainsi, il y a encore une conclusion intéressante qui s'impose: l'alcool déversé par les plantules submergées dans l'eau passe avec elle dans les tiges qui se développent, en raison de l'appel incessant provoqué par la transpiration; si celles-ci ne l'utilisaient pas, elles subiraient le même sort que les autres qui meurent; elles font donc disparaître l'alcool, et aussi l'aldéhyde qui l'accompagne, car je dois ajouter que c'est surtout l'aldéhyde qui tue les plantes submergées et non l'alcool¹.

Mais il me paraît un peu hardi d'affirmer que la circulation de l'air peut être assurée dans toute l'étendue du végétal, par la petite portion qu'on a laissé émerger de l'eau. L'interprétation de M. Duclaux est beaucoup plus rationnelle. Les cotylédons et les régions submergées des tiges sont soumises à l'asphyxie comme les plantes entièrement recouvertes par l'eau; ces régions produisent donc aussi de l'alcool; mais il est brûlé au fur et à mesure de sa formation en même temps que celui qui est apporté par l'eau ambiante; le siège de la combustion, je veux dire de l'utilisation, est placé dans la portion aérienne, qui présente cette double condition d'absorber de l'oxygène à discrétion et d'être un foyer très actif de transformations alimentaires puisqu'elle est exclusivement constituée par des cellules jeunes en voie de multiplication ou de différenciation.

Quelle que soit donc la façon dont on envisage les conséquences de cette expérience, on a le droit d'en conclure que les plantules de pois traitées comme je l'ai dit utilisent l'alcool et même l'aldéhyde.

Mais considérons cette conclusion comme un accident, puisqu'en somme elle se présente comme la suite d'un accident, et cherchons à vérifier les conséquences de la production nécessaire de l'alcool, comme acte préparatoire à l'assimilation, non plus sur des phénomènes provoqués, mais sur ceux qui se présentent comme la manifestation de la vie normale des végétaux.

1. MAZÉ, ces *Annales* (*loc. cit.*).

III

La remarque suivante va nous suggérer tout de suite les expériences destinées à mettre en relief l'existence probable de la transformation des sucres en alcool, même chez les végétaux poussant dans les conditions ordinaires de la vie végétale; les hydrates de carbone fermentescibles perdent, en se disloquant en alcool et acide carbonique, à peu près la moitié de leur poids sous une forme inutilisable pour les végétaux dépourvus de chlorophylle. Si l'alcool est la fraction retenue et utilisée à la construction de nouveaux tissus ou à l'entretien des cellules déjà formées, le poids de végétal édifié aux dépens d'une quantité donnée de sucre ne sera jamais égal à la moitié du poids des sucres consommés; mais si l'on opère, comme je le fais ici, sur des plantes considérées seulement pendant la période germinative, il faut faire une réserve; il y a toujours dans les graines des substances azotées qui contiennent également beaucoup de carbone, d'hydrogène et d'oxygène; ces aliments concourent à la constitution de la plantule; or on ne sait rien sur leur mode de désintégration, et il est possible et même probable que la fraction des composés azotés utilisés soit supérieur à la moitié des molécules initiales.

Lorsqu'on établit le rapport entre le poids de végétal fabriqué et le poids correspondant perdu par les organes de réserves, ou, pour abrégé, le rendement, on obtient la résultante de la contribution des hydrates de carbone d'une part, et des matières azotées d'autre part. On ne peut donc pas demander à cette méthode plus de précision qu'elle ne comporte; mais comme ce sont en général les hydrates de carbone qui prédominent, leur influence demeurera prépondérante, on s'en convaincra d'ailleurs par l'examen des chiffres fournis par l'expérience.

On peut trouver chez les auteurs, même déjà anciens, des renseignements sur cette question; mais on comprend qu'on ne puisse pas les utiliser parce qu'ils ont été obtenus par la mise en œuvre d'une technique insuffisante. On sait, en effet, que lorsqu'on fait germer des graines dans le sable ou dans la terre, les microbes prélèvent sur les substances de réserve une dîme

assez lourde, même chez les organes qui semblent en apparence tout à fait sains.

La graine de choix pour de semblables expériences est le pois; le pois ne renferme que des réserves hydrocarbonées et azotées. Les matières solubles dans l'éther sec ne représentent pas 1 0/0 du poids total de la graine, et encore ce sont plutôt des résines que des matières grasses proprement dites.

J'ai donc soumis à la germination quelques lots de pois à l'abri des microbes; et j'ai évalué le poids de plante fabriquée à l'aide des substances empruntées aux cotylédons. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau suivant :

TABLEAU III

1	2	3	4	5	6	7
N ^{os} d'ordre.	Poids sec des graines	Durée de la germination.	Poids des cotylédons après l'expérience.	Poids perdu par les cotylédons.	Poids des plantules.	Rendement
—	Milligr.	Jours.	Milligr.	Milligr.	Milligr.	—
1	3954	9	3019	935	546	0,58
2	7218	42	5099,4	2118,6	950,3	0,45
3	8052	44	6222	1820	782	0,42
4	2042	45	8406	3636	1540	0,42

Les chiffres de la colonne 7 montrent que, pendant la première période de la germination, le rendement est plus grand que 0,5; ce fait peut être attribué à l'influence des matières azotées; mais il est dû à une autre cause, au moins en partie : au début de la germination, la solubilisation des réserves marche plus vite que la consommation par la plantule; les substances non utilisées s'accumulent principalement dans la tige où les matières amylacées sont représentées par de l'amidon transitoire et des sucres réducteurs; ces aliments non consommés ne devraient pas entrer en ligne de compte dans l'évaluation du rendement; les chiffres obtenus sont donc trop élevés; cette observation est d'ordre général; elle s'applique à toutes les espèces de graines.

Ceci étant dit, on voit que les rendements obtenus rentrent dans la limite prévue. Il est inutile de prolonger la durée de la germination, car on conçoit aisément que le rendement doit diminuer avec les progrès des plantules.

Après avoir examiné un type de graines amylacées, il était tout indiqué de faire les mêmes observations sur des graines à réserves ternaires mixtes, comme le maïs et le lupin blanc, puis

enfin sur des graines à réserves oléagineuses parmi lesquelles le ricin et l'arachide sont tout indiqués.

Le maïs est plutôt une graine amyglacée; mais il renferme aussi des huiles localisées surtout dans le scutellum; en raison de cette situation, ces huiles sont digérées dès le commencement de la germination; c'est donc au début de l'évolution de la plantule que l'on pourra constater l'influence du mode d'utilisation de matières grasses sur les plantules.

Les expériences qui suivent ont été conduites d'une façon un peu différente de celles qui ont été exécutées sur le pois. Les graines ont été mises à germer dans des tubes à essai sur du coton imbibé d'eau, à raison d'une graine par tube. Ce procédé donne de bons résultats avec les semences volumineuses, qui fournissent en peu de temps un poids de végétal assez élevé; il présente en outre l'avantage de choisir à volonté les plantules qui lèvent bien, ce qui permet d'obtenir des résultats comparables.

Les chiffres suivants ont été obtenus avec le maïs :

TABLEAU IV

1	2	3	4	5	6	7
N ^{os} d'ordre.	Poids sec des graines.	Durée de la germination.	Poids des réserves non utilisées.	Poids perdu par l'alburn.	Poids des plantules.	Rendement.
—	—	—	—	—	—	—
	Milligr.	Jours.	Milligr.	Milligr.	Milligr.	
1	502,7	4	463	39,7	32,5	0,82
2	447,5	5	391,5	56	46	0,82
3	300,2	15	278	222,2	133,5	0,60
4	402,2	16	263,7	138,5	79,8	0,57
5	352,4	20	69,6	282,8	163,2	0,58
6	370	26	180	190	92,5	0,48

Les chiffres de la colonne 7 indiquent cette fois que le maïs ne suit pas la règle, posée *a priori*, concernant le mode d'utilisation des matières hydrocarbonées. Il faut voir, dans cette divergence, l'intervention des matières grasses; mais, d'un autre côté, on verra plus loin que les plantules de maïs renferment plus d'aliments non utilisés que le pois; c'est une raison de plus qui parle en faveur d'un rendement élevé.

Tout les physiologistes admettent aujourd'hui que les huiles se transforment en sucres avant d'être utilisées à l'édification de la plantule; si cette transformation est intégrale, on conçoit qu'un poids donné de matières grasses fournisse un poids de végétal supérieur à celui qui s'obtient par l'assimilation d'un poids égal

de substances hydrocarbonées; cette transformation se fait par fixation d'oxygène atmosphérique; si elle n'est pas accompagnée de perte de carbone, elle conduit à un poids de sucres au moins double du poids des substances oléagineuses qui leur ont donné naissance. Si les sucres une fois formés subissent un dédoublement préalable en alcool et acide carbonique, le poids de matière utilisable représentera, à peu de chose près, la quantité primitive de matières grasses, de sorte que le poids de plante fabriqué, rapporté aux huiles consommées, sera égal à l'unité. C'est ce qu'on va vérifier dans un instant. Quand les réserves ternaires sont constituées, comme chez le maïs, par un mélange d'huiles et d'hydrates de carbone, le rendement devra être également supérieur à 0,5; envisagés de cette façon, les chiffres du tableau IV ne présentent pas d'ambiguïté.

Les résultats que j'ai obtenus avec le lupin blanc donnent lieu aux mêmes observations, avec cette différence qu'ils s'écartent encore plus des chiffres prévus pour le pois.

Le lupin blanc renferme en effet 12,54 0/0 de matières solubles à l'éther sec; le maïs n'en contenait que 4,82 0/0. Le lupin blanc que j'ai utilisé renfermait en outre, 7 à 8 0/0 de sucres évalués en glucose, et pas d'amidon; dans cette graine ce sont les réserves azotées qui prédominent; et pour cette raison, les chiffres consignés dans le tableau suivant ne peuvent fournir que des indications assez vagues.

TABLEAU V

1	2	3	4	5	6	7
Nos d'ordre.	Poids sec des graines.	Durée de la germination.	Poids des cotylédons.	Poids perdu par les cotylédons.	Poids des plantules.	Rendement.
—	Milligr.	Jours.	Milligr.	Milligr.	Milligr.	—
1	474,9	3	444	30,9	20	0,64
2	411,2	5	340,5	70,7	52	0,73
3	461,2	6	381,5	81,7	61,5	0,76
4	412	10	267	145	102	0,70
5	469,4	12	329,3	140,1	103	0,73
6	434	15	194,5	239,5	175	0,73

Le caractère le plus saillant des chiffres qui expriment le rendement, c'est leur constance; ce fait doit appeler l'attention sur le mode d'utilisation des matières azotées; il semblerait indiquer en outre que l'assimilation des matières grasses se fait lentement, parallèlement à celle des matières azotées; mais ce n'est là qu'une simple supposition; il se peut, comme je l'ai déjà

dit, que les substances protéiques de réserves fournissent un poids de végétal supérieur à 0,5; mais l'examen de cette question ne rentre pas dans les limites de ce travail. Je me contenterai de faire remarquer que les aliments les plus facilement assimilables de la graine de lupin blanc sont les sucres; selon toute vraisemblance, ce sont eux qui disparaissent les premiers, et cette particularité se traduit par le rendement assez curieux 0,64.

Parmi les graines oléagineuses on a le choix entre le ricin et l'arachide; mais j'ai été contraint à me borner à l'étude de la germination de l'arachide, car le ricin ne germe pas si on le soumet aux conditions imposées par ce procédé d'expérimentation¹.

Le tableau VI donne les résultats fournis par l'arachide.

1	2	3	4	5	6	7
Nos d'ordre.	Poids sec des graines.	Durée de la germination.	Poids des cotylédons.	Poids perdu par les cotylédons.	Poids des plantules.	Rendement
—	Milligr.	Jours.	Milligr.	Milligr.	Milligr.	—
1	402,4	6	353,5	49	45,5	0,93
2	585,6	10	426	159,6	152,5	0,96
3	448,8	17	361,5	87,3	91,5	1,05
4	405,2	20	152,5	252,7	221,5	0,88
5	360	24	51,1	308,9	293,5	0,95
6	422	26	121,2	300,8	228	0,77
7	495,8	30	114	381,8	302	0,82
8	393,2	35	79,8	313,4	211	0,67

L'examen de ces chiffres conduit à la conclusion prévue, le rendement croît pendant la première période de la germination; on en trouve facilement l'explication dans ce fait que la graine d'arachide renferme de petites quantités d'amidon et des sucres,

1. Cette graine placée sur du coton imbibé d'eau n'entre jamais en germination; il en est de même sur les perles de verre, soit qu'on l'immerge en partie ou qu'on la mette simplement en contact avec l'eau, soit qu'on la place au contraire à une certaine hauteur au-dessus du niveau du liquide. Ce résultat tient probablement à la constitution anatomique de la graine, on sait quelle est composée d'un périperme et d'un embryon muni de deux feuilles cotylédonaire accollées l'une à l'autre, entourés de toutes parts par le périperme.

L'espace qui sépare les cotylédons et celui qui les isole du périperme n'existent que virtuellement; mais comme ces organes sont simplement juxtaposés, ils se laissent envelopper par voie de capillarité par une mince couche liquide, dès que la graine touche l'eau; elle est donc placée à peu près dans les mêmes conditions que si elle avait été entièrement submergée; on ne peut pas en effet attribuer la non-germination au procédé de stérilisation, car des graines maintenues sur des perles de verre pendant des semaines et des mois germent très bien quand on les place dans du sable très poreux et modérément mouillé.

ceux-ci évalués en glucose représentent en moyenne, pour l'échantillon de graines qui m'a servi, 4 0/0 du poids sec des semences; c'est évidemment aux dépens de ces sucres que la plantule effectue son premier développement; le rendement croît peu à peu à mesure que les matières grasses contribuent pour une part plus large à l'édification de la plante, pour décroître ensuite lorsque la somme des pertes réunies de construction et d'entretien dépasse le gain réalisé sous forme de fixation d'oxygène sur les matières grasses.

Mais, dans tous les cas, le rendement oscille dans le voisinage de l'unité pendant la période de temps que l'on peut considérer comme représentant la durée normale de la germination.

J'aurai pu multiplier davantage ces expériences; mais je pense qu'on n'en aurait pas tiré grand profit; les exemples que j'ai rapportés s'appliquent aux différents types de graines que l'on peut rencontrer; ils résument bien les faits que je voulais mettre en évidence, et comme on a pu le remarquer, aucun d'eux n'est en opposition avec la possibilité de la transformation de la totalité des réserves ternaires en alcool et acide carbonique avant l'incorporation de leur carbone à la substance vivante.

Mais on ne peut pas leur demander la démonstration de ce fait; mieux que cela, l'affirmation que je viens d'énoncer suppose implicitement, chez ces diverses espèces végétales, un mode d'utilisation unique des aliments ternaires dont elles disposent; il se peut que les choses se passent autrement; les huiles fournissent un meilleur rendement parce qu'elles donnent moins de déchets à la digestion; mais le déchet se traduit par la production d'eau et d'acide carbonique; s'il y a moins d'acide carbonique éliminé chez l'arachide que chez le pois pour l'édification de l'unité de poids de végétal, on s'explique que celle-là fournisse un meilleur rendement que celui-ci; mais la quantité d'acide carbonique produit est susceptible d'être mesurée; c'est donc un point sur lequel on peut se renseigner.

D'un autre côté, on s'est appuyé dans le cours de ces expériences sur ce fait que les matières grasses subissent une transformation préalable en sucres avant d'être utilisées par la plantule. En réalité, l'existence de cette transformation n'a été prouvée que chez le ricin¹; on ne possède pas de démonstration

¹ 1. MAQUENNE, *C. R.*, t. CXXVII, p. 625.

directe de ce fait pour toutes les autres graines oléagineuses. On a été conduit à l'admettre par des raisonnements d'analogie. On sait que les sucres constituent pour les végétaux l'aliment ternaire par excellence. Le dextrose, le lévulose, le galactose et le mannose se présentent comme directement assimilables; et on a constaté que partout où ils se rencontrent, dans les semences ou dans les feuilles, concurremment avec d'autres substances plus complexes, ce sont eux qui disparaissent les premiers pendant que les autres se dégradent à leur tour et passent par les mêmes états avant de servir à l'alimentation.

Les graines oléagineuses renferment, à côté d'une forte proportion de matières grasses, des quantités plus ou moins grandes de sucres et souvent de l'amidon; ce sont évidemment les hydrates de carbone qui sont, en grande partie, consommés les premiers, de sorte que si l'on trouve, à un moment quelconque de la germination, une quantité de sucres plus faible ou plus élevée que la quantité initiale, on peut affirmer qu'ils dérivent des substances grasses; ce raisonnement est d'autant plus logique que la valeur du rapport $\frac{CO_2}{O}$ semble en confirmer la conclusion; le quotient respiratoire est voisin de l'unité pour les graines amylacées comme le pois; sa valeur baisse avec la richesse des semences en huiles, elle tombe à 0,60 chez le ricin et elle se maintient dans le voisinage de ce chiffre pendant que la plantule consomme les huiles.

Que ce raisonnement par analogie traduise ou non la réalité, il n'en est pas moins vrai que, pour asseoir sur cette déduction des arguments destinés à étayer les résultats fournis par de nouvelles expériences, il faudrait d'abord s'assurer de son exactitude.

IV

Commençons par établir qu'il n'existe pas chez les végétaux supérieurs, ceux du moins qui ne renferment comme réserves ternaires que des hydrates de carbone et des huiles, plusieurs modes d'utilisation du carbone ternaire. On peut, comme je l'ai fait remarquer, s'en rendre compte par la mesure de la quantité de CO_2 qui correspond à l'élaboration d'un poids donné de végétal. Si elle est la même chez les différentes espèces de graines,

on aura le droit de conclure que le rendement élevé constaté chez les graines oléagineuses n'est pas dû à un mode d'assimilation plus économique que celui qui se déroule dans les semences amylacées.

Voici les chiffres que j'ai déjà publiés sur cette question¹.

	CO ₂ dégagé 0/0 de plante fabriquée.	Durée de l'expérience.
Arachide.....	95,66	10 jours.
Mais.....	88,49	8 —
Haricot.....	88,6	8 —
Pois.....	4,3	8 —

J'ai repris ces expériences dans le but de pénétrer plus avant dans le mécanisme du phénomène.

Voici comment elles ont été réalisées : les graines débarrassées de microbes sont placées sur des perles de verre avec une quantité suffisante d'eau distillée. Le récipient dans lequel elles sont disposées est un vase conique de 300 c. c. de captivité, assez fort pour résister au vide; son col est muni d'un étranglement au-dessous duquel se trouve une tubulure latérale munie aussi d'étranglements, qui, comme le précédent, ont pour but de fixer en place des tampons de coton; ce vase est fermé par un bouchon en caoutchouc, percé d'un trou qui livre passage à un tube pourvu aussi d'un tampon de coton. L'appareil ainsi monté est stérilisé à 120° pendant un quart d'heure, et il est alors prêt à recevoir les graines.

Pour recueillir l'acide carbonique, et aussi pour favoriser la germination, on fait circuler un courant d'air dans le récipient; il faut donc dépouiller l'air de l'acide carbonique qu'il renferme normalement; ce résultat s'obtient par l'interposition en avant du vase conique : 1° d'un barboteur à potasse concentrée; 2° d'un tube en U rempli de fragments de potasse caustique; 3° d'un barboteur à eau destiné à restituer à l'air la vapeur d'eau qu'il a perdue, afin de prévenir une trop grande évaporation du liquide de germination.

Après avoir passé dans le vase conique, l'air cède sa vapeur d'eau : 1° à une éprouvette remplie de chlorure de calcium fondu; 2° à un tube en U de grandes dimensions rempli de ponce sulfurique. Il circule ensuite dans une série de récipients tarés destinés à donner, par leur augmentation de poids, l'acide carbonique cherché; ils comprennent : un tube en U à ponce sulfurique, un barboteur Liebig modifié à potasse concentrée, un deuxième tube à ponce sulfurique, un tube en U rempli de fragments de potasse caustique, un troisième tube à ponce sulfurique. Enfin, une éprouvette remplie de chlorure de calcium fondu empêche le retour de la vapeur d'eau de l'aspirateur qui n'est autre qu'une trompe à eau. Tous les raccords de l'appareil sont constitués par du caoutchouc à vide. Une pince à vis placée en avant du récipient à graines permet d'interrompre à volonté la communication avec la partie antérieure de l'appareil, tandis qu'une autre isole la

1. *C. R.*, t. CXXX, p. 424.

deuxième éprouvette de chlorure de calcium de la trompe et sert en outre à régler la vitesse du courant d'air.

Pour recueillir l'acide carbonique retenu par les cotylédons, on fait le vide deux fois dans l'appareil, pendant qu'on soumet les graines à une température croissante qui monte lentement jusqu'à 65°.

Quand on voulait recueillir l'alcool produit, suivant les conditions de l'expérience, on intercalait, entre le récipient qui renfermait les graines et la première éprouvette à chlorure, un double barboteur à eau distillée plongeant dans la glace fondante, laquelle était protégée contre la chaleur rayonnante par un système de deux bocal en verre laissant entre leurs parois un espace assez large qu'on remplissait de coton; on en recouvrait aussi toute la partie supérieure du bocal intérieur.

Toutes les expériences qui suivent ont été faites à la température de 29-30° dans une étuve complètement obscure, éclairée faiblement par un bec papillon pendant le temps nécessaire aux manipulations.

Voilà, au point de vue de l'installation, les conditions dans lesquelles je me suis placé.

Pour mettre en relief l'importance des résultats et faire ressortir clairement les renseignements que je leur demandais, j'ai toujours mené de front deux ou quatre expériences. A côté d'une expérience destinée à évaluer la quantité d'acide carbonique produit par la construction et l'entretien d'un poids donné de plante, j'ai installé parallèlement une autre expérience portant sur le même poids de graines placées dans les mêmes conditions, mais préalablement débarrassées de leurs embryons¹.

Les résultats que j'ai obtenus avec le pois sont résumés dans le tableau VII.

Parmi toutes ces expériences, il y en a qui dénotent une germination très médiocre; ce sont les expériences 2 et 3; dans l'expérience 1, la germination a été passable; 4 et 5 attestent une évolution rapide de la plantule.

Ces différences tiennent à l'âge des semences; les pois conservés 7 ou 8 mois germent mal dans les conditions imposées par ces expériences; ils sont placés dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau et semblent souffrir de l'absence de transpiration active; ce ne sont pas les opérations auxquelles on les

1. L'ablation de l'embryon est facile lorsqu'il s'agit de graines de maïs ou d'arachide; mais les pois doivent subir un trempage préalable de 24 heures; ce trempage doit être fait, précédé d'une stérilisation des graines d'une part, et de l'eau dans laquelle on les submerge d'autre part. L'excision des embryons doit être faite dans des conditions d'asepsie rigoureuse, et pour plus de précaution on soumet les cotylédons ainsi préparés à une série de nouveaux lavages avec de l'eau stérile.

TABLEAU VII

	1		2		3		4		5	
	Graines germées.	Graines germées.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.	Graines submergées
Poids initial des graines.....	2009,6	2042,3	2097,6	2107	2025,8	2025,8	4972	4972	2340	2340
Durée de l'expérience.....	6	6	7	7	40	40	6	6	6	6
Poids des plantules.....	437,9	403,2	40	»	53,7	»	225	»	235	»
Poids des cotylédons.....	1624,7	1690,8	1651,8	»	»	»	1494	»	1835	»
Extrait sec dans le liquide.....	78,2	61,8	15,7	»	»	»	39,4	»	73,9	»
CO ²	535	289,3	268,9	238,8	380,8	298,4	292,9	240,6	319,4	243,7
Différence CO ² graine — CO ² cotyl.	—	»	+30,4	»	+52,4	»	+52,3	»	+75,7	»
Rapport ₁ $\frac{\text{CO}^2 \text{ graines}}{\text{Plantules}}$	2,42	2,8	6,72	»	6,51	»	4,3	»	4,35	»
Rapport ₂ $\frac{\text{Diff. CO}^2 \text{ gr.} - \text{CO}^2 \text{ cotyl.}}{\text{Plantules}}$	»	»	0,75	»	0,97	»	0,23	»	0,32	»

a soumises pour les débarrasser de microbes qui ont affaibli leur pouvoir germinatif, car si on les place dans du sable, elles germent très bien¹. Pour obtenir de bons résultats, il faut prendre les graines sur la plante même, au moment où les gousses sont bien sèches. Les expériences 4 et 5 ont été faites avec des pois récoltés dans la gousse. Faute de prendre ces précautions on s'expose à avoir des résultats dénués de valeur, car l'expérience comparative faite avec des cotylédons ne suffit pas à faire disparaître les irrégularités. La ration d'entretien des plantules qui se développent lentement représente une fraction trop élevée des aliments consommés.

Le fait le plus intéressant qui se dégage des chiffres du tableau VII, c'est l'activité des échanges gazeux entre l'atmosphère et les cotylédons privés de leurs embryons; ils produisent, à peu de chose près, autant d'acide carbonique que les graines pourvues de leur plantule.

J'ai déjà fait remarquer qu'il n'y a aucune raison d'admettre que les cotylédons isolés de l'embryon agissent sur leurs réserves d'une façon différente des graines entières, les uns et les autres étant placés dans les conditions favorables à la germination. Tout au plus peut-on supposer que l'oxygène pénètre plus facilement dans les profondeurs des cotylédons lorsqu'ils tiennent à la plantule, en faveur de l'irrigation que celle-ci y provoque; mais cela ne peut que favoriser le dégagement d'acide carbonique et les chiffres fournis par l'expérience précédente pour les cotylédons sont peut-être inférieurs à ceux que l'on obtiendrait avec ces organes adhérents à la plante, si on en pouvait faire le départ. Cela veut dire que le travail préparatoire de l'assimilation s'effectue dans les cotylédons jusqu'au terme alcool et au delà, de sorte que l'on peut dire cette fois que l'alcool est non pas un produit accidentel ainsi que je l'ai admis provisoirement, mais une substance que les organes de réserve préparent normalement et régulièrement, du moins chez le pois.

Je ne veux pas dire par là que les hydrates de carbone de

1. Ce résultat constitue une traduction expérimentale de ce fait d'observation courante que le pouvoir germinatif va en s'affaiblissant avec la durée de conservation des graines. A une époque où elles semblent avoir gardé cette faculté intacte, puisqu'elles germent très bien dans le sable humide, la germination en atmosphère saturée décèle une atténuation de l'activité diastatique, comparativement avec les semences prises au moment de la maturité.

réserve subissent intégralement cette transformation dans les cotylédons; ce serait nier l'évidence, car tout le monde sait que la plantule reçoit en même temps de la dextrine, des sucres réducteurs, que l'on trouve dans les cellules de la plante, soit à l'état d'amidon transitoire, soit à l'état de sucres.

Ces substances sont toujours abondantes, et beaucoup plus que l'alcool; cela se conçoit puisque c'est celui-ci qui est consommé le premier; mais l'alcool n'est jamais absent non plus, et chaque fois que j'ai voulu vérifier sa présence, j'ai toujours réussi à le caractériser.

Remarquons en outre que les graines entières submergées de l'expérience 5, produisent à peu près la même quantité d'acide carbonique que les cotylédons exposés à l'air; ces graines ont donné naissance à 210 milligrammes d'alcool. Étant donnée la difficulté de retenir tout l'alcool, le rapport de l'acide carbonique à l'alcool formé, même dans les graines submergées en présence de l'air, montre bien que ce phénomène est régi par la même loi suivant laquelle s'effectue la fermentation alcoolique pure. Cela confirme la conclusion de MM. Godlewsky et Polzeniusz; mais ce qui est intéressant surtout, c'est de constater par cette expérience qu'il n'existe aucune diastase capable de dégager de l'acide carbonique, aux dépens des matières azotées de réserve, en l'absence d'oxygène. C'est une remarque qui a sa valeur et que j'aurai l'occasion de faire avec l'*Eurotyopsis Gayoni*. Ce qui se dégage de tous ces faits, c'est que dans les graines submergées, dans les cotylédons exposés à l'air ou dans ceux qui restent attachés à la plantule qu'ils alimentent, le mécanisme de la formation d'acide carbonique est partout le même; il est dû à une même cause qui agit partout avec la même activité. C'est dire qu'il n'y a pas, du moins chez le pois, deux modes d'action de la cellule vivante vis-à-vis de ses aliments, caractérisant la vie végétative ou la vie fermentative; il n'y a que des manifestations différentes, en apparence seulement, d'un mode de vie unique, suivant les conditions que nous imposons à la cellule vivante, ou qu'elle se crée elle-même plus ou moins accidentellement, par le jeu des forces physicochimiques qu'elle met en œuvre.

Les graines de pois germant normalement à la faveur des conditions favorables à leur évolution produisent de l'alcool et

l'utilisent à la construction de leurs tissus. Les mêmes graines placées dans l'eau, ou dans une atmosphère privée d'oxygène, produisent de l'alcool qu'elles ne peuvent utiliser parce que l'oxygène fait défaut; elles ne construisent pas de substances vivantes.

Prenons maintenant les chiffres des premières colonnes des expériences 4 et 5, et faisons le bilan du poids de matière soumise à l'expérience. On obtient les résultats suivants :

TABLEAU VIII

	Expérience 4.	Expérience 5.
	Milligr.	Milligr.
Poids des plantules.....	225	235
Poids cotylédons	449,4	483,5
Extrait dans l'eau	39,4	73,9
Acide carbonique dégagé	292,2	349,4
Total après l'expérience...	2054,3	2463,3
Poids initial	1933	2340
Différence.....	+ 118,3	+ 123,3

Que représente cette différence? l'eau d'hydratation des matières ternaires et surtout l'oxygène emprunté à l'atmosphère. Mais on sait que le volume d'oxygène absorbé, par le pois en voie de germination est très voisin du volume d'acide carbonique dégagé. Dans ces conditions, l'oxygène absorbé, calculé d'après l'acide carbonique obtenu, est, dans l'expérience 4, 213 milligrammes et 232,3 dans l'expérience 5, c'est-à-dire 2 fois plus que l'excédent de poids observé que l'on ne saurait cependant rapporter en entier à l'oxygène fixé.

Il y a donc environ la moitié de l'oxygène libéré par l'acide carbonique qui provient de l'oxygène des composés de réserve, et la moitié de l'oxygène emprunté à l'atmosphère qui a dû se combiner à l'hydrogène pour s'éliminer à l'état d'eau.

Il semble que l'on puisse dire le contraire, et traduire cette observation de la façon suivante : l'acide carbonique se forme par la combinaison directe de l'oxygène atmosphérique avec le carbone de la plante, et c'est l'oxygène des substances de réserve qui a fourni le déficit constaté en s'éliminant à l'état d'eau. Cette manière de voir est contredite par les faits, et c'est la première conclusion qui traduit la réalité. Si l'on fait remarquer en outre que la portion d'oxygène empruntée à l'atmosphère qui se retrouve dans l'acide carbonique a dû se fixer sur les substances alimentaires, comme dans l'exemple de la transformation des

matières grasses en sucres, pour se dégager par des mutations ultérieures, on est conduit à cette notion qu'il n'y a, probablement, aucune corrélation entre l'absorption d'oxygène et le dégagement d'acide carbonique. M. Duclaux insiste longuement sur ce fait¹.

J'ai fait les mêmes expériences avec le maïs et avec l'arachide; les résultats qu'ils m'ont fournis sont exposés dans le tableau IX.

Le maïs a très bien germé comme on le voit; c'est d'ailleurs une plante qui s'accommode fort bien à l'humidité; l'arachide a fourni des résultats moins bons; et comme on ne peut pas récolter ses graines soi-même, il est bien difficile de prévenir cet inconvénient; cependant, dans mes premières expériences, j'avais obtenu une germination très satisfaisante (voir p. 211):

Les éléments du tableau IX qu'il s'agit de mettre en parallèle avec ceux qui sont relatés dans le tableau VIII, concernent les différentes valeurs trouvées pour les rapports, et₁. Ces rapports représentent, comme on l'a vu, la quantité d'acide carbonique dégagé, pendant toute la durée de l'expérience, par l'unité de poids de plante pourvue de ses cotylédons, et par l'unité de poids de plantule. Les rapports₁ sont fournis directement par l'expérience; les rapports₂ ont été obtenus en calculant la différence entre l'acide carbonique éliminé par les végétaux entiers et celui qui a été dégagé par les cotylédons privés de leurs embryons, et en divisant le chiffre obtenu par le poids des plantules; cette différence doit être mise en effet, avec pourtant quelques réserves, sur le compte des plantules.

Pour plus de commodité je réunis ci-dessous les principaux chiffres obtenus :

TABLEAU X

	Pois.	Maïs.	Arachide.
Rapport ₁	1,3	0,94	1,18
Rapport ₂	0,23	0,71	0,62

Comme on le voit, le pois fournit des chiffres différents des deux autres plantes, lesquelles donnent au contraire des résultats à peu près de même ordre.

Considérons d'abord les rapports₂; ils résultent de deux actions bien distinctes : celle des cotylédons et celle de la plan-

¹ A. DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, t. III, p. 346. Masson, Paris.

TABLEAU IX

	<i>Mais.</i>				<i>Arachide.</i>			
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Graines germées, et scutellum.	Graines germées.	Albumen scutellum.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.	Cotylédons.	Graines germées.
Poids initial des graines.....	3666,5	3666,5	3429,9	3249,9	4415,5	4415,5	4430	4430
Durée de l'expérience.....	6	6	6	6	14	14	16	16
Poids des plantules.....	438,4	»	412,4	»	242	»	360,2	»
Poids des cotylédons.....	2896	»	2717	»	3989	»	3676	»
Extrait séché dans l'eau de germination...	54,4	»	30,4	»	420,4	»	463,7	»
CO ₂ dégagé.....	443,2	416,9	383	423,4	393,8	483,8	427,6	201,3
Différence CO ₂ graines — CO ₂ cotylédons.	+296,3	»	+289,6	»	+212	»	+226,4	»
Rapport ₁ $\frac{\text{CO}_2 \text{ graines}}{\text{Plantules}}$	0,94	»	0,93	»	4,63	»	4,18	»
Rapport ₂ $\frac{\text{Diff. CO}_2}{\text{Plantules}}$	0,71	»	0,63	»	0,87	»	0,62	»

tule; si les cotylédons poussent la digestion des réserves assez loin, de façon à fournir à la plantule une fraction importante des aliments à l'état d'alcool, il s'éliminera dans ces organes une grande quantité de CO_2 , la plantule en libérera d'autant moins; la valeur du rapport₂ sera faible; c'est ce qui se produit chez le pois.

Si, au contraire, les aliments ternaires sont simplement hydrolysés dans les organes de réserve, l'élimination d'acide carbonique se fera de préférence dans les plantules; le rapport₂ sera élevé; le maïs en fournit l'exemple; il en est de même chez l'arachide.

Ce résultat se trouve exprimé sous une autre forme dans le tableau I; on a vu en effet que les pois submergés fabriquent beaucoup d'alcool; le maïs et l'arachide placés dans les mêmes conditions en donnent au contraire très peu.

J'ai fait remarquer que cela tenait en partie à la nature des réserves; mais il est probable que la nature de la graine y joue aussi un certain rôle. Tout se passe chez le pois comme si la graine s'approvisionnait en diastases sur la plante mère au cours de la maturation.

Elle conserve cet héritage plus ou moins intégralement jusqu'au moment de la germination, et c'est pour cela que le pouvoir germinatif va en s'affaiblissant avec la durée de la conservation de la graine.

D'une manière générale, toutes les semences sont pourvues d'une certaine quantité de diastases empruntées à la plante mère. MM. Brown et Morris¹ ont montré que la richesse des organes verts des plantes en diastases varie dans des limites très étendues, et précisément c'est le pois qui vient, et de beaucoup, au premier rang, dans la liste assez longue de plantes qu'ils ont observées; les graminées sont moins riches que les légumineuses.

C'est probablement à cette particularité qu'il faut rattacher les variations que j'ai observées dans la production d'alcool par les graines submergées, car il n'y a aucune raison d'admettre que la zymase ne suive pas les mêmes lois que l'amy-lase; mais il n'y a que les apparences qui plaident en faveur de ce rapprochement, c'est une question à étudier.

1. *Journal of the Ch. S.*, mai 1893.

Je dois enfin faire observer que les valeurs trouvées pour les rapports, ne sont qu'approximatives, elles ne peuvent être exactes qu'autant que la marche de la digestion dans les cotylédons n'est pas influencée par la plantule, comme cela se présente chez le pois; mais il est certain que chez l'arachide, dont les cotylédons augmentent considérablement de volume, les phénomènes de digestion qui s'accomplissent dans ces organes changent d'allure à mesure que l'air y circule plus facilement; c'est d'ailleurs ce que l'on va voir plus loin; ces modifications ont pour résultat d'augmenter la quantité d'acide carbonique dégagé par les organes de réserve; j'ai admis également que la présence de la plantule doit activer l'élimination d'acide carbonique dans le scutellum du maïs, les chiffres 0,71 et 0,62 sont donc plus forts que les chiffres réels.

Mais quelles que soient la grandeur et la nature de ces influences, les rapports, conservent leur valeur.

Ici encore, le pois fournit un résultat différent des deux autres plantes examinées. C'est là un fait que l'on ne peut pas interpréter avec ce que nous savons; j'ai déjà visé la cause probable de cette différence (p. 205), le moment est venu de vérifier la justesse de cette remarque.

Le poids des plantules ne représente pas seulement le poids des substances vivantes fabriquées aux dépens des matériaux empruntés aux organes de réserves, il comprend encore un certain nombre de composés alimentaires tels que les sucres et l'amidon transitoire qui n'ont pas subi de transformations assez avancées pour donner naissance à de l'acide carbonique.

L'accumulation de ces substances dans la plantule peut être provoquée par deux causes: l'étendue des transformations qui s'opèrent dans les cotylédons sous l'influence des diastases; là où il y a dislocation du sucre en alcool et acide carbonique, on doit constater dans les plantules une accumulation peu abondante d'aliments non transformés; mais s'il y a simplement hydrolise des matières amylacées, la plantule reçoit une plus grande quantité de sucres et de dextrine, et par conséquent peut en faire de nouvelles réserves si toutefois la consommation n'est pas trop considérable; il est clair, en effet, que la vitesse relative de la consommation constitue la deuxième cause de variation dans la quantité d'aliments transitoires susceptibles de se déposer dans la plantule.

J'ai évalué, en conséquence, la quantité de sucres et de matières saccharifiables obtenue en soumettant les tiges de pois, de maïs et d'arachides pulvérisés à l'action de l'acide sulfurique à 2 0/0 à la température de 120° pendant 20 minutes.

Les matières réductrices ont été dosées par le procédé Lehmann modifié par Maquenne et évaluées en glucoses ; c'est cette méthode que j'ai toujours employée dans le cours de ce travail.

La germination a été réalisée à la température de 29-30°, à l'étuve obscure ; les graines étaient placées dans du sable mouillé avec de l'eau distillée.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XI

	Durée de la germination.	Sucres et matières saccharifiables 0/0 de poids sec des plantules.
Maïs.....	5 jours	27,72
Arachide.....	6 —	15,92
Pois.....	6 —	14,41

J'ai fait, en outre, un examen plus détaillé de l'accumulation des hydrates de carbone non utilisés dans les plantules d'arachide, suivant la marche de la germination.

Les graines ont été préalablement stérilisées et placées séparément dans des tubes sur du coton plongeant dans l'eau distillée.

On a fait deux lots des plantules qui ont été soumises en entier, tiges et racines, à la saccharification. Le premier lot comprenait les plantules qui avaient très bien poussé. Le deuxième, celles qui avaient assez bien germé.

L'examen du tableau suivant montre que, dans ces conditions, la richesse des plantules en sucres est variable.

TABLEAU XII

Lots.	Durée de la germination.	Poids moyen des plantules.	Sucres et matières saccharifiables 0/0.	
			Dans les cotylédons.	Dans les plantules.
	Jours.	Milligr.		
1	14	98,1	13,71	16,67
2	id.	57,7	10,75	21,10
	<i>Autre lot, pris avec les tiges seulement.</i>			
3	12	»	»	25,48

Ainsi, bien qu'on n'ait pas tenu compte des matières grasses déposées dans la tige, lesquelles émigrent aussi en nature des cotylédons dans cet organe, l'excédent de sucres et matières saccharifiables dans le maïs et l'arachide montre que c'est bien

à la variation de ces produits, suivant les espèces végétales, qu'il faut attribuer les différences observées dans les valeurs des rapports₁.

On est donc autorisé à répondre à la première des questions posées, p. 209, qu'il n'existe chez ces différentes espèces de graines qu'un mode d'utilisation des réserves ternaires, puisque la fabrication de l'unité de poids de plantule entraîne un déchet de carbone à peu près constant à l'état d'acide carbonique.

Et si l'on remonte aux conclusions formulées, p. 215, sur les relations qui existent entre la vie végétative du pois et sa vie fermentative, on est fondé également à généraliser cette notion et à dire qu'un végétal quelconque transforme et utilise ses aliments suivant une loi générale, toujours la même, quelles que soient les conditions de milieu qu'on lui impose. Si on observe l'arrêt du développement de la plantule, ce n'est pas parce que les fonctions de la plante ont été déviées de leur voie normale, c'est parce qu'on a supprimé un des rouages du mécanisme, tel un chronomètre qui ne marque plus l'heure parce qu'on en a retranché une roue.

V

Il s'agit maintenant d'examiner la deuxième question posée (p. 209). J'ai déjà fait remarquer que la transformation des matières grasses en sucres est admise par tous les physiologistes; et j'ai exposé en quelques mots quelles sont les raisons qui plaident en faveur de cette conception. Mais, comme je l'ai dit aussi, à part la démonstration faite par M. Maquenne sur le ricin, il n'existe aucune preuve directe de cette transformation. On a suivi les modifications chimiques qui interviennent dans les substances oléagineuses pendant le cours de la germination; mais on n'a pas dégagé d'une façon assez nette les relations qui lient la présence des hydrates de carbone aux mutations survenues dans les différentes catégories d'aliments, pour faire la part exacte des matières grasses.

Les matières azotées de réserves sont certainement capables de former plus ou moins directement une certaine quantité de substances hydrocarbonées pendant le cours de la germination; mais on ignore la proportion de sucres qui dérive de ces

composés, de même qu'on ne sait rien du sort réservé à la glycérine mise en liberté par la saponification des huiles; on peut supposer comme M. Maquenne qu'elle donne naissance à des glucoses, ou tout au moins à des substances capables de réduire la liqueur de Fehling; il faut donc en tenir compte aussi; mais les produits susceptibles de se transformer en sucres pendant le travail de la digestion, ce sont les hydrates de carbone plus ou moins polymérisés que les semences renferment toujours en plus ou moins grande abondance. On peut se renseigner sur la proportion de sucres provenant de cette source, dans les graines en voie de germination; mais si on en trouve un excédent dont on ignore l'origine, on n'aura le droit de les rapporter aux huiles qu'autant qu'on sera certain que les matières azotées et la glycérine n'ont pas suffi à leur donner naissance.

Le principe de toute méthode destinée à établir la transformation des matières grasses en sucres consiste donc à mettre en évidence la présence d'une quantité telle d'hydrates de carbone, à un moment quelconque de l'évolution de la graine, qu'on ne puisse les attribuer en totalité aux modifications subies par les aliments de réserve, à l'exclusion des substances oléagineuses.

L'expérience réussit très bien avec le ricin, mais elle échoue avec les graines à réserves cotylédonaire si on se contente d'examiner à des époques plus ou moins espacées l'accumulation des hydrates de carbone dans les cotylédons et les plantules pendant le cours de la germination. Si on cherche à interpréter ces résultats, on voit tout de suite qu'on peut les rapporter à plusieurs causes.

L'acide ricinoléique, qui constitue la presque totalité des réserves du ricin, est un acide alcool incomplet présentant un groupement allylique et en conséquence plus facilement oxydable que les acides oléiques ou saturés qui se rencontrent dans les autres graines oléagineuses.

Mais si d'un autre côté, on étudie la physiologie de la germination avec différentes espèces de graines oléagineuses, ricin, arachide, courge, crucifères, etc..., on constate que la valeur du quotient respiratoire, la production de substances vivantes aux dépens d'un poids donné de réserves oléagineuses ne conduisent pas à assigner au ricin une place à part parmi les semences riches en huiles.

On doit donc se demander aussi si l'anatomie de la graine de ricin n'est pas favorable à l'accumulation des produits de transformation des huiles dans les feuilles cotylédonaire et dans la tige de la plantule.

Le ricin, je l'ai dit, possède un organe de réserves, le périperme indépendant de l'embryon qu'il recouvre de toutes parts. Le périperme du ricin, comme l'endosperme des graminées, est un organe inerte; ce qui tend à le prouver, c'est l'impossibilité de faire germer le ricin dans les conditions exposées (p. 208), car si les cellules du périperme jouaient un rôle actif dans la digestion des réserves, on aurait pu en constater les effets dans le cours de ces essais.

Il faut donc admettre que l'embryon seul produit les diastases digestives; celles-ci passent par diffusion dans le tissu de réserves où elles agissent sur les aliments. Cette disposition anatomique doit avoir pour conséquence une sécrétion abondante de diastases et une transformation rapide des matériaux de réserves, exactement comme dans les graminées. Si la consommation des sucres marche plus lentement que la production, ces composés s'accumuleront dans les différents organes de la plante; c'est ce qui se produit.

Dans l'arachide, les cellules cotylédonaire sécrètent des diastases et agissent sur leur contenu indépendamment les unes des autres, comme M. Duclaux l'a observé chez d'autres espèces de légumineuses; mais le travail de la digestion est lent et la consommation des sucres semble marcher de pair avec la production. Ces conclusions ont été mises en relief par les recherches de M. Maquenne.

Il en résulte que si l'on veut étendre les conclusions de ce savant relatives à l'acide ricinoléique, aux acides gras en général, il faut provoquer l'accumulation des produits de transformations diastasiques dans les cotylédons, en modérant ou en empêchant la consommation.

Si on fait varier les conditions de la germination, on constate que la richesse en sucres n'est pas comparable d'une condition à l'autre. Les plantes qui ont germé dans du sable sont moins riches que celles qui ont été placées dans des tubes, et parmi celles-ci ce sont en général celles qui germent le moins bien qui présentent le taux de matières hydrocarbonées le plu

élevé. V. tableaux XI et XII. Il y aurait peut-être là un moyen détourné d'établir la relation cherchée.

Mais j'ai donné la préférence au procédé suivant : on excise avec un instrument bien tranchant la base de la graine, au-dessus du point d'insertion des cotylédons sur la tigelle, de façon à supprimer l'embryon.

On stérilise les cotylédons ainsi traités et on les place sur des perles de verre et un peu d'eau distillée dans des flacons d'Erlenmeyer qui ont été stérilisés préalablement; et on expose les cotylédons à la température de 29-30°.

Cette expérience ne fournit pas les résultats cherchés ; je l'ai fait durer des semaines et des mois pour aboutir au même insuccès. La perte par gazéification marche plus vite que le gain par oxydation ; on constate toujours une diminution de poids assez légère cependant. On ne peut pourtant pas admettre que les cellules cotylédonaire ne prennent aucune part à la digestion des huiles dans les conditions où j'ai opéré.

Il faut chercher ailleurs la cause de l'insuccès. Il se peut qu'il soit dû à des mauvaises conditions d'humidité, car les cotylédons placés dans des vases fermés seulement au coton sont exposés à une évaporation trop active, et il faut de temps à autre ajouter de l'eau distillée.

Dans une série d'autres essais, j'ai placé les graines débarassées de leurs embryons dans un appareil clos, disposé de façon à permettre d'établir à volonté une circulation d'air et à recueillir tout l'acide carbonique dégagé.

Voici les résultats que j'ai obtenus dans ces conditions :

TABLEAU XIII

Matières grasses 0 0 avant l'expérience.....				53,22
Sucres et matières saccharifiables.....				14,96
		N° 1.		N° 2.
Poids des cotylédons avant l'expérience....		7893 mgr.		6459 mgr.
Poids sec après l'expérience. { Extrait	735,7	{ 8118,7	659	{ 6639
{ Cotylédons..	7383		5980	
Gain de subst. fixes 0/0 du poids initial....		2,85		2,79
Mat. sol. à l'éther sec —		55,37		55,45
Sucres et mat. sacchar. dans les cotylédons				
0/0 du poids initial.		7,56		6,35
— — dans l'extrait 0/0 du				
poids initial.....		manqué		manqué
Acide carbonique dégagé.....		632 mgr.		534 mgr.
Durée de l'expérience.....		41 jours		41
Alcool trouvé dans les cotylédons.....		»		20 mgr.

L'étude de ces chiffres montre que l'expérience ne peut pas fournir de résultats concluants malgré sa durée relativement grande. Le dosage des sucres dans l'extrait a été manqué; mais on voit bien que les quantités qu'on y aurait trouvées n'auraient pas comblé la différence entre 7,56, quantité fournie par les cotylédons, et 14,96, chiffre initial. On voit donc qu'une fraction importante de sucres a dû subvenir au travail de gazéification qui se traduit par un dégagement assez élevé d'acide carbonique.

Il y a eu pourtant une légère augmentation de poids de substances fixes malgré la perte par gazéification; mais elle se retrouve en grande partie dans les matières grasses qui ont subi un commencement d'oxydation.

Quand on observe les cotylédons après l'expérience, on remarque qu'ils n'ont perdu aucun de leurs caractères extérieurs; ils sont encore cassants et d'un blanc laiteux; la tranche seulement a bruni sur une très faible épaisseur; les grains d'amidon sont plus groupés et peut-être plus nombreux qu'au début.

L'impression qui se dégage de cet examen montre que les cellules cotylédonaire sont restées complètement inaccessibles à l'air, et c'est pour cela que les huiles n'ont subi qu'une légère oxydation; l'absence de plantule a donc exercé ici encore une influence indirecte sur la digestion des réserves en ce sens que les cotylédons ont conservé leur volume primitif; dans les conditions ordinaires de la germination, les cotylédons d'arachide augmentent beaucoup de volume à mesure que la plantule évolue, et on constate également que les faisceaux vasculaires s'élargissent jusque dans leurs plus fines ramifications. Ce sont là des conditions favorables aux phénomènes d'oxydation et qu'il faut remplir.

Pour cela, j'ai fait germer des graines séparément dans des tubes, et au bout de douze jours j'ai pris celles qui avaient le mieux poussé. On en a détaché les cotylédons en sectionnant les pétioles à la base du limbe et on en a fait trois lots; un a été soumis à l'analyse et les deux autres ont été placés en observation dans les mêmes conditions que ceux qui ont servi à l'expérience précédente, en prenant toutefois la précaution de retenir l'alcool dans des barboteurs doubles placés dans la glace fondante.

Toutes ces opérations de germination et de séparation des cotylédons, préliminaires de l'expérience, exigent, comme on le comprend, des précautions minutieuses d'asepsie; les cotylédons détachés des plantules ont été soumis à de nouveaux lavages à l'eau stérile; on a perdu de cette façon une petite quantité de sucres qui a pu diffuser à travers la section des pétioles, car les lavages durèrent plusieurs minutes; mais on n'en a pas tenu compte.

J'ai consigné dans le tableau ci-dessous les résultats de cette expérience.

TABLEAU XIV

	Lot n° 1.	Lot n° 2.
Poids sec initial des cotylédons.....	2261,3 mgr.	2450,2
Poids final —	2031,2	1874,2
Extrait dans l'eau distillée (1).....	584,1 } 2615,3	469 } 2343,6
Augmentation 0/0 du poids initial.....	15,64	8,77
Mat. solubles dans l'éther av. l'expérience.	46,90 0/0	46,99
— — — ap. —	50,136 0/0	49,50
Sucres et matières sacchar. av. l'expér.		
— — — en glucose.	341,63 mgr.	324,8
— — — ap. l'expér.	468,4	348,8
Gain en sucres et mat. saccharifiables		
rapporté à 100 du poids initial	5,60	4,11
Acide carbonique recueilli.....	376,8 mgr.	429,1
Alcool formé (2).....	0,0	0,0
Durée de l'expérience.....	47 jours	47 j.

Le lot n° 2 fournit des résultats différents du lot n° 1, bien que les deux expériences aient été exécutées simultanément; cela tient au développement d'un bacille, qui a contaminé les cotylédons; j'ai eu l'occasion de dire dans ce mémoire que les microbes rendent incertains et erronés tous les résultats des expériences faites sur les graines si on ne prend soin d'opérer sur des échantillons préalablement stérilisés; l'expérience n° 2 vient confirmer cette assertion et montrer quelle est l'importance des actions microbiennes qui s'exercent à côté de celles des plantules; elle donne une idée des erreurs auxquelles on est exposé lorsqu'on laisse se développer librement, dans ce genre de recherches, moisissures et bactéries.

1. Le poids de l'extrait est élevé parce que les cotylédons ont été soumis, avec le liquide des barboteurs, à la distillation, dans le but de rechercher l'alcool.

2. On n'a pas trouvé d'alcool; l'expérience précédente en avait fourni parce que l'aération des tissus cotylédonaire était insuffisante.

Voyons maintenant quelle est la valeur des arguments fournis par le lot n° 1.

Faisons d'abord remarquer qu'à l'activité vitale des cotylédons se manifeste par le dégagement d'acide carbonique; si on prend comme point de comparaison cette production d'acide carbonique, pour donner une idée de la vitesse des transformations des aliments de réserve dans les cotylédons, tableaux XIII et XIV, on voit qu'elle est deux fois plus grande dans les cotylédons qui ont germé préalablement, et si l'on tient compte du temps, elle est cinq fois plus rapide que dans les cotylédons obtenus en sectionnant la base des graines normales.

Cette activité se traduit, d'autre part, par une prolifération cellulaire qui a son siège dans les portions de pétioles restés adhérents aux cotylédons; ces régions s'allongent beaucoup, et sur quelques-uns des pétioles il se forme des rudiments de folioles; tout cela prouve que la circulation de l'air était assurée dans la masse des organes de réserves. De ce côté par conséquent, le but est atteint.

Les résultats se chiffrent en faveur des sucres et matières saccharifiables par un excédent de 5,60 0/0 du poids de matière soumise à l'expérience.

Dans le bilan, je n'ai pas fait la part des matières celluliques ni de la glycérine ni des matières azotées.

D'après les observations de M. Maquenne sur l'arachide, la quantité de cellulose va toujours en augmentant dans les graines en voie de germination; ici nous pouvons la considérer comme constante, bien que l'on ait observé une prolifération cellulaire.

Quant à la glycérine, on admet généralement qu'elle se transforme en sucres chez les végétaux supérieurs; on cite à l'appui de cette assertion la formation d'amidon dans les feuilles dont les pétioles plongent dans une solution de glycérine; mais, dans l'expérience ci-dessus, les aliments de réserve sont simplement soumis à l'action des diastases digestives; les conditions sont toutes différentes, car l'amidon se dépose dans les feuilles seulement en présence d'un grand excès de l'un des composés susceptibles de lui donner naissance.

Mais en admettant la possibilité d'une transformation synthétique de la glycérine, son rôle dans la genèse des sucres doit être tout à fait effacé dans les conditions où je me suis placé.

Ou bien, en effet, la glycérine produite dès le début de la germination par la saponification des matières grasses est absorbée avant les acides gras en raison de son assimilabilité plus grande, et alors elle a disparu complètement pendant la germination préalable de douze jours qui a précédé l'expérience, ou bien, au contraire, elle est consommée parallèlement aux acides gras et proportionnellement à ceux-ci, et dans ces conditions la fraction qui a pris part aux transformations dont les colydélons ont été le siège, est tout à fait insuffisante pour expliquer l'origine de l'excédent de sucres obtenus.

Restent les matières azotées ; celles-ci renferment, on le sait, des chaînons sucrés ; de plus, il est probable qu'elles peuvent donner naissance à des matières saccharifiables, non pas pendant le travail de la digestion, mais au cours des transformations que les cellules des plantules leur font subir ; j'aurai justement l'occasion de préciser ce point dans le mémoire suivant ; mais ici on peut faire observer, comme pour la glycérine, que les matières azotées sont simplement soumises à un travail de dédoublement diastasique accompagné de phénomènes d'oxydation, et que la quantité de matières azotées intéressées dans l'expérience ne peut pas fournir une proportion aussi considérable de sucres. On ne peut donc rattacher leur formation, au moins pour la plus grande partie, qu'aux matières grasses, et plus exactement aux acides gras.

Je dois enfin faire remarquer que l'expérience n'a duré que dix-sept jours ; on aurait pu tripler cette durée et rien ne permet de supposer qu'on n'aurait pas pu doubler la quantité de sucres en excédent.

Je n'ai pas non plus tiré parti de la quantité de sucres qui a été gazéifiée dans le cours de cette expérience ; or, tous les faits relatés dans ce mémoire, concernant la production d'acide carbonique dans les cotylédons, montrent que ce composé provient presque en totalité du dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique.

En admettant que la moitié seulement de l'acide carbonique dégagé provienne de ce dédoublement, on est certain de se trouver au-dessous de la réalité ; mais cela suffit pour doubler l'excédent de sucres obtenu, et doubler aussi, à peu de chose près, la quantité initiale de sucres et matières saccharifiables que

renfermaient les cotylédons. Pour traduire les faits par des chiffres, on aurait exactement, après l'expérience, 26,4 0/0 du poids initial en sucres et matières saccharifiables, contre 15,09 au début, ce qui fait un excédent de 11,31 0/0.

On constate également une augmentation sensible de matières grasses, exactement 3,25 0/0; ceci n'a rien qui doive nous surprendre. Les huilés exposées à l'air, à une température de 30°, fixent plus ou moins d'oxygène et augmentent par conséquent de poids; les matières grasses émulsionnées des cellules cotylédonaire réunissent toutes les conditions favorables à l'oxydation énergique suivant un processus purement chimique. On peut cependant faire remarquer que l'influence de la cellule vivante, ou mieux des diastases qu'elle met en œuvre, se traduit précisément par une exaltation très accentuée des phénomènes d'oxydation capables de s'accomplir lentement en dehors de leur intervention.

C'est évidemment ce qui se produit dans les graines oléagineuses; et ce qui distingue le processus diastasique du processus chimique, c'est que le premier, tout en exaltant le phénomène, l'oriente, en même temps, vers un but défini, lequel est ici la formation des sucres. On ne constate pas seulement une augmentation de poids des matières solubles à l'éther, on observe aussi une transformation graduelle de ces composés qui les rend peu à peu solubles dans l'eau, alors même qu'ils ne sont pas encore susceptibles d'être caractérisés comme sucres.

Ce qui le prouve, c'est que l'augmentation de poids des matières grasses ajoutée à l'excédent des sucres et matières saccharifiables ne représente que 8,85 0/0 du poids initial, tandis que le gain total atteint 15,64 0/0.

La différence doit être attribuée aux composés intermédiaires solubles dans l'eau qui forment une partie de l'extrait, car cette augmentation de poids ne peut être rattachée à aucune des autres catégories de substances de réserves, puisque l'acide carbonique et l'eau résultant de la combustion respiratoire ne sont pas considérés dans cette augmentation de poids.

On peut donc affirmer que l'assimilation des huiles par les graines en voie de germination exige leur transformation préalable en sucres, lesquels sont ensuite dédoublés en alcool et acide carbonique; aucune des observations faites dans le cours

de ce mémoire ne vient infirmer cette double conclusion, et toutes tendent à l'appuyer dans la mesure où la complexité des transformations qui se passent dans les cotylédons et les plantules permet de démêler les résultats.

CONCLUSIONS

Les conclusions que j'ai tirées des différentes expériences que j'ai rapportées dans ce mémoire ont été exposées à leur place; je n'y reviendrai pas. Je me contenterai de faire observer que les réserves hydrocarbonées ou oléagineuses sont utilisées par la plantule à la suite d'une série de transformations qui aboutissent à un même composé : l'alcool.

On doit se demander si c'est là le terme final auquel aboutit le carbone ternaire avant d'être combiné aux aliments azotés et soumis aux transformations progressives qui aboutissent à la substance vivante. J'ai déjà avancé que l'alcool est probablement oxydé et transformé en aldéhyde éthylique plus apte à contracter avec les noyaux quaternaires des combinaisons multiples; mais le moment n'est pas encore venu de traiter ce point.

A côté de cette question, il y en a une autre qui se pose tout naturellement : n'existe-t-il qu'un mode unique d'utilisation du carbone ternaire chez les végétaux supérieurs? Il est probable qu'il y en a plusieurs. Mais avant de se procurer les moyens de les mettre en évidence, il était indispensable de se renseigner sur celui qui paraît prédominer.

Cependant, il y en a un qui semble tellement évident qu'il est impossible, en apparence, d'élever le moindre doute sur son existence. C'est la transformation des sucres en cellulose, ou plus exactement en substances polymères des sucres en C^6 et C^5 susceptibles de se dédoubler en leurs constituants sous l'influence des acides bouillants.

La membrane cellulosique est une partie intégrante de la cellule végétale, et, pour cette raison, le mode de formation des celluloses constitue un processus d'assimilation, au même titre que celui qui préside à l'incorporation du carbone ternaire à la substance vivante. Mais la conception qui admet qu'elles dérivent de la condensation des sucres n'est pas générale. M. Laborde ¹ a

1. Ces *Annales*, 1897, p. 1.

montré que l'*Eurotyopsis Gayoni*, qui se développe sur un milieu minéral ne renfermant que de l'alcool éthylique, ou de l'acide lactique, etc..., comme aliment organique utilisable, fabrique sa membrane cellulosique avec la même facilité apparente que s'il avait du sucre à sa disposition.

On peut faire observer qu'il commence d'abord par fabriquer ce sucre qui lui manque pour en faire ensuite des substances cellulosiques. C'est sur ce point que j'aurai quelques observations à présenter dans le mémoire suivant.

En terminant, je ferai remarquer enfin que tous les résultats acquis sur l'assimilation chez les graines en voie de germination sont applicables à la plante adulte; celle-ci ne diffère de la plante qu'en ce qu'elle fabrique elle-même ses aliments hydrocarbonés par la synthèse chlorophyllienne, et qu'elle tire son azote des nitrates et de l'ammoniaque du sol.

Construite aux dépens de l'azote minéral et des hydrates de carbone, la plante adulte doit présenter une composition telle que l'hydrogène et l'oxygène s'y trouvent dans la même proportion que dans l'eau, puisque le quotient respiratoire montre qu'il y a à peu près autant d'oxygène emprunté à l'atmosphère qu'éliminé à l'état de gaz carbonique.

Or, on sait qu'il n'en est pas ainsi; la composition moyenne montre qu'il y a plus d'hydrogène que n'en indique cette hypothèse. Le mode d'utilisation du carbone ternaïre, exposé p. 215, rend parfaitement compte de ce résultat. Les observations de M. Müntz (*loc. cit.*), de M. Berthelot¹, de M. Devaux², sur la présence de l'alcool dans les végétaux supérieurs, viennent également à l'appui de mes conclusions. J'aurais pu essayer de vérifier ce fait comme conclusion de mes recherches sur les plantules de pois, par exemple, en les soumettant à l'analyse élémentaire; mais les chiffres n'auraient pas présenté la netteté voulue à cause de la présence d'une grande quantité d'aliments non transformés, et aussi à cause de l'intervention des composés azotés qui, tout en changeant de nature, se modifient peu au point de vue de leur composition.

1. *C. R.*, *loc. cit.*

2. *C. R.*, t. CXXVIII, p. 1347.